



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

**"CARACTERIZACIÓN DE LAS
PROTEÍNAS TIM COMO
RECEPTORES DE
FOSFATIDILSERINA"**

DOCTORANDO:

ÁNGELA BALLESTEROS MORCILLO

DIRECTOR:

DR. JOSÉ M. CASASNOVAS SUELVES

**DEPARTAMENTO DE ESTRUCTURA DE
MACROMOLÉCULAS**

**CNB-CSIC
MADRID, 2012**



Esta Tesis doctoral se ha desarrollado en el Centro Nacional de Biotecnología bajo la dirección del Dr. José M. Casasnovas, y ha sido financiada con una beca predoctoral del programa de Junta de Ampliación de los Estudios (JAE) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Además se disfrutó de una estancia en el laboratorio del Dr. Gerardo G. Kaplan en el National Institutes of Health (NIH) gracias al programa de estancias breves de la beca JAE del CSIC.



JUNTA PARA AMPLIACIÓN DE ESTUDIOS



INDICE:

ABREVIATURAS:	IX
RESUMEN:	XI
1. INTRODUCCIÓN:	1
1.1. Identificación de la familia de proteínas TIM.	1
1.2. Estructura de las proteínas TIM.	1
1.2.1. Dominio N-terminal.	2
1.2.2. Dominio mucina.	4
1.2.3. Dominio Citoplasmático.	4
1.3. TIM-1.	4
1.3.1. Expresión celular y función de TIM-1.	4
1.3.2. Ligandos descritos para TIM-1.	5
1.4. TIM-3.	6
1.4.1. Expresión celular y función de TIM-3.	6
1.4.2. Ligandos descritos para TIM-3.	6
1.5. TIM-4.	7
1.5.1. Expresión celular y función de TIM-4.	7
1.5.2. Ligandos descritos para TIM-4.	8
1.6. TIM-2.	8
1.6.1. Expresión celular y función de TIM-2.	8
1.6.2. Ligandos descritos para TIM-2.	9
1.7. Polimorfismos descritos en las proteínas TIM.	10
1.7.1. Polimorfismos de TIM-1.	11
1.7.2. Polimorfismos de TIM-3.	12
1.8. La fosfatidilserina.	13
1.9. Receptores de FS.	16
1.9.1. Receptores intracelulares de FS.	16
1.9.2. Receptores extracelulares de FS.	17
1.9.2.1. Factores de coagulación sanguínea.	17
1.9.2.2. Receptores de FS expuesta en células apoptóticas.	18
1.10. Eliminación de células apoptóticas o fagocitosis.	20
1.11. Consecuencias en el sistema inmune del fallo en la eliminación de células apoptóticas.	22
2. OBJETIVOS:	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS:	27
3.1. cDNAs y anticuerpos.	27
3.1.1. cDNAs.	27

3.1.2. Anticuerpos.	27
3.2. Producción de proteínas TIM murinas en bacteria.	27
3.2.1. Expresión del dominio N-terminal de las proteínas TIM en bacteria.	27
3.2.2. Preparación del dominio N-terminal de las proteínas TIM mediante replegamiento <i>in vitro</i> .	30
3.3. Producción de proteínas TIM en células de mamífero.	31
3.3.1. Producción de proteínas TIM-Fc solubles en células de mamífero.	31
3.3.2. Producción de proteínas TIM-Fc mutantes en células de mamífero.	33
3.4. Cristalización y determinación de la estructura del dominio N-terminal de las proteínas TIM murinas.	35
3.4.1. Cristalización y determinación de la estructura del dominio N-terminal de mTIM-4.	35
3.4.2. Cristalización y determinación de la estructura del dominio N-terminal de mTIM-3.	37
3.5. Cristalización y determinación de la estructura del dominio N-terminal de las proteínas TIM murinas en complejo con Fosfatidilserina (FS).	38
3.5.1. Cristalización y determinación de la estructura del dominio N-terminal de mTIM-4 en complejo con FS.	38
3.5.2. Cristalización y determinación de la estructura del dominio N-terminal de mTIM-3 con FS.	39
3.6. Preparación de Liposomas.	40
3.7. Ensayos de unión de las proteínas TIM-Fc a FS.	42
3.7.1. Ensayos de unión de las proteínas TIM-Fc a FS en liposomas.	42
3.7.2. Ensayos de competición de la unión de las proteínas TIM-Fc a FS en liposomas.	42
3.7.3. Ensayos de unión de las proteínas TIM-Fc a fosfolípidos evaporados en placa.	43
3.8. Ensayos de unión de las variantes polimórficas de TIM-1 a células apoptóticas.	44
3.9. Ensayos de adsorción de las proteínas TIM murinas a monocapas lipídicas.	45
3.9.1. Ensayos de adsorción de las proteínas TIM murinas a una interfase líquido-aire.	45
3.9.2. Ensayos de inserción de las proteínas TIM murinas a monocapas de FS.	46
3.10. Espectros de fluorescencia intrínseca de las proteínas TIM murinas en presencia de liposomas.	47
3.11. Experimentos de SPR con las proteínas TIM murinas.	48
3.11. 1. Cálculo de las cinéticas de unión y afinidad de las proteínas TIM por FS mediante SPR.	49
3.11. 2. Cálculo de los valores termodinámicos de la interacción de las proteínas TIM murinas por FS mediante SPR.	50
4. RESULTADOS:	53
4.1. Preparación de las proteínas TIM murinas.	53
4.1.1. Preparación de las proteínas TIM solubles en sistemas eucariotas.	53
4.1.2. Preparación de los dominios N-terminales de las proteínas TIM murinas solubles en un sistema bacteriano.	54
4.2. Estructura cristalográfica de los dominios N-terminales de las proteínas TIM-3 y TIM-4 murinas.	58
4.2.1. Cristalización y determinación de la estructura del dominio N-terminal de mTIM-4.	58
4.2.2. Estructura del dominio N-terminal de mTIM-4.	59
4.2.3. Cristalización y determinación de la estructura del dominio N-terminal de mTIM-3.	62
4.2.4. Estructura del dominio N terminal de mTIM-3.	63
4.3. Variabilidad conformacional en el dominio IgV de las proteínas TIM.	65

4.3.1. Conformación del lazo CC' en dominios IgV de las proteínas TIM y otras proteínas homólogas de la superfamilia de las inmunoglobulinas.	65
4.3.2. Variabilidad conformacional de los lazos CC' y FG en las proteínas TIM murinas.	66
4.4. Caracterización de las proteínas TIM como receptores de fosfatidilserina.	68
4.4.1. Unión de las proteínas TIM murinas a fosfatidilserina en membranas.	68
4.4.2. Ensayos de competición de la unión de las proteínas TIM a FS.	70
4.4.3. Estructura cristalográfica de los dominios N-terminales de las proteínas mTIM-3 y mTIM-4 en complejo con fosfatidilserina.	71
4.4.3.1. Cristalización y determinación de la estructura de mTIM-4 con FS.	71
4.4.3.2. Estructura del dominio N-terminal de mTIM-4 en complejo con FS.	72
4.4.3.3. Cristalización y determinación de la estructura del dominio N-terminal de mTIM-3 en complejo con fosfatidilserina.	74
4.4.3.4. Estructura del dominio N-terminal de mTIM-3 en complejo con FS.	75
4.4.4. Contribución de los residuos del dominio IgV de las proteínas TIM en el reconocimiento de FS.	78
4.4.4.1. Contribución de los residuos del lazo FG al reconocimiento de FS.	78
4.4.4.2. Contribución de los residuos del lazo CC' al reconocimiento de FS.	79
4.4.4.3. Contribución de los residuos del lazo BC al reconocimiento de FS.	79
4.5. Variantes polimórficas de TIM-1 y TIM-3, papel de los polimorfismos en el reconocimiento de FS.	80
4.5.1. Interacción de las variantes polimórficas de mTIM-3 con FS.	80
4.5.2. Interacción de las variantes polimórficas de TIM-1 con FS	83
4.6. Análisis biofísico de la interacción de las proteínas TIM con FS en membranas.	84
4.6.1. Variación de la tensión superficial de una monocapa de FS en presencia de las proteínas TIM.	84
4.6.2. Análisis espectroscópico de la interacción de las proteínas TIM con FS en liposomas.	86
4.7. Determinación de la afinidad de las proteínas TIM por FS en membranas.	92
5. DISCUSIÓN:	97
5.1. Estructura del dominio N-terminal de las proteínas TIM murinas.	97
5.2. Interacción de las proteínas TIM con FS.	99
5.3. Las proteínas TIM como receptores de FS.	103
5.3.1. TIM-4 como receptor de FS expuesta en células apoptóticas.	104
5.3.2. TIM-4 como receptor de FS en la superficie de exosomas.	105
5.3.3. TIM-1 como receptor de FS.	106
5.3.4. Las variantes polimórficas de TIM-1 en el reconocimiento de FS.	106
5.3.5. TIM-3 como receptor de FS.	107
5.3.6. Las variantes polimórficas de TIM-3 en el reconocimiento de FS.	108
5.3.7. Observaciones finales.	108
6. CONCLUSIONES:	111
7. BIBLIOGRAFÍA:	113
ANEXO I: PUBLICACIONES.	126
1. Portada revista Immunity volumen 26, número 3. Marzo 2007. Structure-Function of Tim receptors	127
2. Structures of T Cell Immunoglobulin Mucin receptors 1 and 2 reveal mechanisms for regulation of immune responses by the TIM receptor family.	128

3. Portada revistaImmunity volumen 27, número 6. Diciembre 2007. TIM Glycoproteins Mediate Phagocytosis of Apoptotic Cells. **140**
4. Structures of T Cell Immunoglobulin Mucin protein 4 show a Metal-Ion-Dependent Ligand Binding Site where phosphatidylserine binds. **141**
5. T Cell/Transmembrane, Ig, and Mucin-3 allelic variants differentially recognize phosphatidylserine and mediate phagocytosis of apoptotic cells. **153**

ABREVIATURAS:

AHR: Hiperrespuesta en las vías respiratorias.
BSA: Seroalbumina bovina.
CAR: Receptor coxsackie adenovirus.
CD: Célula dendrítica.
cDNA: Ácido desoxirribonucleico codificante.
CEA: Antígeno carcinoembrionario.
CPA: Célula presentadora de antígeno.
CT: Célula T.
DCFS: Dicaproil Fosfatidilserina.
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium.
DNA: Ácido desoxirribonucleico.
DO: Densidad óptica.
DTT: Dithiothreitol.
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.
EEA: Encefalitis experimental autoinmune.
ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
ESRF: European Synchrotron Radiation Facility.
FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting.
FC: Fosfatidilcolina.
FCS: Suero fetal bovino.
FS: Fosfatidilserina.
HAV: Virus de la hepatitis A.
HAVcr-1: Receptor celular 1 del virus de la hepatitis A o TIM-1 humano.
Hepes: 4- (2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid).
HRP: Peroxidasa del rábano.
HSV: Virus Herpes simple
IC₅₀: La mitad de la concentración máxima inhibitoria de un compuesto.
IFN- γ : Interferon gamma.
Ig: Inmunoglobulina.
IgA: Inmunoglobulina A.
IgG: Inmunoglobulina G.

IgSF: Superfamilia de las inmunoglobulinas.

IgV: Inmunoglobulina de tipo Variable.

IL: Interleucina.

k_{aso} : Constante de asociación.

KD: Constante de afinidad.

kDa: Kilo dalton.

k_{dis} : Constante de disociación.

Kim-1: Kidney Injury Molecule 1 o TIM-1.

LB: Luria Broth medium.

LUV: Large unilamellar vesicles.

MILIBS: Metal ion-dependent ligand binding site.

NK: Célula natural killer.

OPD: Orto-fenilendiamina.

pb: Pares de bases.

PBS: Tampón fosfato salino.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PEG: Polietilenglicol.

pI: Punto isoeléctrico.

PKC: Proteína quinasa K.

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

RNA: Ácido ribonucleico.

rpm: Revoluciones por minuto.

RU: Unidades de resonancia.

Sema4: Semaforina 4A.

SM: Esfingomielina.

SMUCKLER: spleen, mucin-containing, knockout of lymphotoxin o TIM-4

SPR: Resonancia de plasmones de superficie.

TCR: Receptor de células T.

Th1: Celula T tipo Th1.

Th17: Celula T tipo Th17.

Th2: Celula T tipo Th2.

TIM: T-Cell/Transmembrane Immunoglobulin domain and mucin domain protein.

TLRs: Receptores tipo Toll.

u.a.: Unidades arbitrarias.

RESUMEN:

The T-cell/Transmembrane immunoglobulin and mucin domain (TIM) proteins play an important role in the regulation of the innate and adaptive immune responses. Structures of the N-terminal domain of the murine TIM receptors revealed a conserved immunoglobulin (Ig) type V fold (IgV), with four Cys residues bridging a distinctive CC' loop to the GFC β -sheet. Crystal structures of murine IgV domain of mTIM-4 identify a metal ion-dependent ligand binding site (MILIBS) conserved in all TIM proteins, except in mTIM-2. The characteristic CC' and FG loops of TIM IgV domain shape a narrow cavity where acidic compounds penetrate and coordinate to a metal ion bound to conserved residues in TIM proteins. The structure of the IgV domains of mTIM-4 and mTIM-3 bound to phosphatidylserine (PS) show that the hydrophilic head penetrates into the MILIBS and coordinates with the metal ion, whereas the hydrophobic residues lining the pocket walls interact with the apolar phospholipid moiety. Mutation of protein residues engaged in metal ion coordination or building up the MILIBS in the IgV domain decreases binding of TIM proteins to PS, proving the relevance of this site in ligand recognition. Biophysical studies show that the MILIBS walls penetrate into membrane surfaces containing PS. A model for TIM protein binding to PS in membranes is provided.

Polymorphisms of TIM proteins have been related to susceptibility to various atopic diseases, particularly asthma. In this work we show that TIM polymorphisms play a role in recognition of PS by TIM proteins. The TIM-1 mucin polymorphic variants differ in PS binding when TIM-1 protein is expressed on the cell surface. Moreover, mTIM-3 polymorphic variants present PS binding differences due to distinct contacts with the membrane surface. Therefore, susceptibility to atopic diseases might be linked to distinct affinities of the TIM proteins for PS.

Research included in this Thesis demonstrated that the TIM proteins (TIM-1, TIM-3 and TIM-4) are pattern recognition receptors specialized in the recognition of PS, a cell death signal. PS is exposed on the outer membrane when a cell undergoes apoptosis, being recognized by TIM proteins. Recognition of apoptotic cells can lead to either cell engulfment (TIM-3 and TIM-4), a key biological process for maintenance of tissue homeostasis and prevention of autoimmunity, or cell stimulation (TIM-1 and TIM-3). Therefore TIM proteins are a functional repertoire for recognition of apoptotic cells, a process that can lead to immune activation or tolerance, depending on the TIM molecule and cell type on which it is expressed.

1. INTRODUCCIÓN:

1.1. Identificación de la familia de proteínas TIM.

Los genes que codifican para la familia de proteínas TIM (T-Cell/Transmembrane Immunoglobulin domain and Mucin domain), fueron identificados en el año 2001 mediante clonaje posicional en un modelo murino de asma ya que están localizados en un locus regulador de hiperreactividad inmunitaria relacionado con susceptibilidad a asma y alergias en ratones (90, 91). La familia TIM está formada por ocho genes en ratones (Tim-1 a Tim-8), localizados en el cromosoma 11B1.1 murino, y tres en humanos (HAVCR1/TIM-1, HAVCR2/TIM-3 y TIMD4/TIM4), localizados en el cromosoma 5q33.2 humano. Los genes TIM codifican al menos cuatro proteínas murinas (mTIM-1, mTIM-2, mTIM-3 y mTIM-4) y tres humanas (TIM-1, TIM-3 y TIM-4). No se ha descrito ortólogo humano para Tim-2.

TIM-1 fue el primer miembro de la familia TIM identificado como receptor celular del Virus de la Hepatitis A (HAV). La proteína TIM-1 ó HAVcr-1 (Hepatitis A virus celular receptor 1) se identificó inicialmente en células de Mono Verde Africano en el año 1996 (61), y dos años más tarde en humanos (36). Simultáneamente se publicó un trabajo donde se observó la sobreexpresión de TIM-1 en células epiteliales de riñón tras daño renal severo. En este trabajo, la proteína TIM-1 se denominó Kim-1 (Kidney Injury Molecule 1) (57). Años más tarde, en el 2002, se publicó otro trabajo, donde la búsqueda de nuevos marcadores de superficie para distinguir los subtipos Th1 y Th2 de células T, condujo a la identificación de la familia de genes TIM, que se relacionó con la regulación del sistema inmune (74, 98). Durante los últimos años se han publicado numerosos trabajos que muestran la implicación de esta familia de proteínas en la regulación de la respuesta inmune y su relación con patologías inmunitarias, como tolerancia en trasplantes, desarrollo de autoinmunidad, asma y alergias, así como con infecciones virales (159).

1.2. Estructura de las proteínas TIM.

Los miembros de la familia TIM son proteínas de membrana celular de tipo I. La región extracelular de las proteínas TIM está compuesta por un dominio N-terminal rico en cisteínas, seguido por un dominio mucina rico en treoninas, serinas y prolina (TSP)

con numerosos sitios potenciales de O-glicosilación, y un pequeño dominio que denominamos D3 próximo a la membrana plasmática, que contiene sitios potenciales de N-glicosilación relativamente conservados en la familia (Fig. 1.1). Estas proteínas están ancladas a la membrana celular por una única región transmembrana y presentan un dominio citoplásmico con tirosinas que forman parte de motivos de fosforilación tirosina quinasa. Estos motivos de fosforilación están presentes en todas las proteínas de la familia, excepto en TIM-4. Sin embargo, las proteínas TIM-4 humana y murina son las únicas proteínas de la familia TIM que presentan un motivo RGD en su dominio N-terminal (Fig. 1.1) (131). La secuencia RGD se encuentra comúnmente en proteínas de la matriz extracelular, siendo un elemento central para la unión de estas proteínas a integrinas, implicadas en numerosos procesos de adhesión celular. Por lo tanto, se ha hipotetizado que las proteínas TIM-4 humana y murina podrían ser ligandos de integrinas y desempeñar funciones de adhesión celular (21).

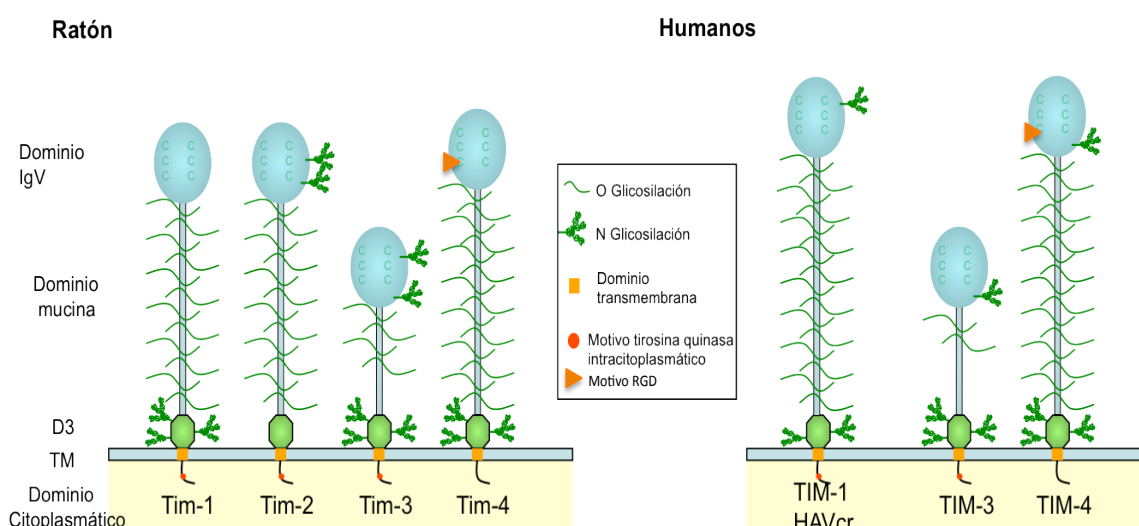


Figura 1.1 Representación esquemática de la estructura modular de las proteínas TIM murinas y humanas. Los dominios IgV, mucina, D3, Transmembrana (TM) y citoplasmático aparecen señalados. Las O-glicosilaciones se muestran como líneas verdes, mientras que las N-glicosilaciones se muestran como ramilletes triples verdes. El motivo tirosina quinasa del dominio citoplasmático aparece señalado como una esfera roja. El motivo RGD presente en el dominio IgV de TIM-4 se señala como un triángulo naranja.

1.2.1. Dominio N-terminal.

Los dominios N-terminales ricos en cisteínas de los diferentes miembros de la familia TIM son muy similares en secuencia, con una identidad que ronda el 40% entre las proteínas de una misma especie y del 60% entre proteínas homólogas de ratón y humano. La región N-terminal rica en cisteínas es crítica para la unión de las proteínas a sus

ligandos. Así mismo, el dominio N-terminal de TIM-1 es esencial para la unión y la neutralización de HAV por una forma soluble de HAVcr-1/TIM-1 (134). Aunque se había predicho que la estructura de este dominio era del tipo inmunoglobulina (Ig), el número de cisteínas que presenta es inusual para este tipo de dominios (7).

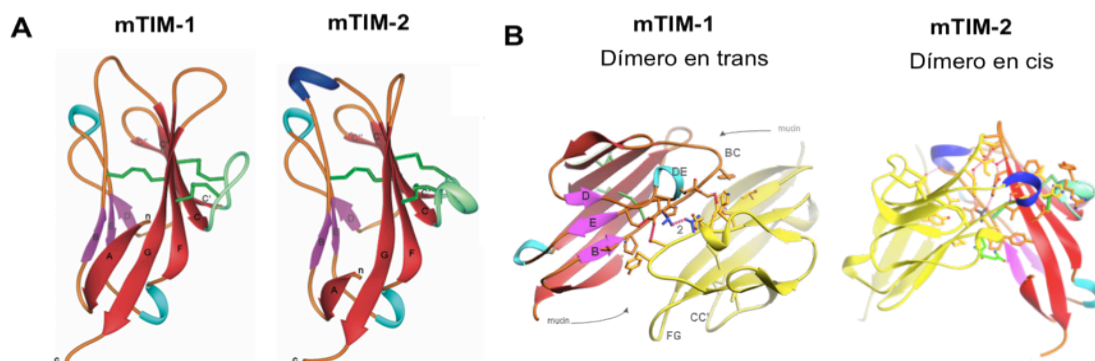


Figura 1.2. Estructura cristalográfica de los dominios N-terminales de mTIM-1 y mTIM-2. A. Diagramas de las estructuras cristalográficas de los dominios N-terminales de mTIM-1 y mTIM-2. Las hebras β AGFC se muestran coloreadas en rojo, mientras que las hebras β BED aparecen coloreadas en magenta. Las hélices α aparecen coloreadas en cian y las hélices α en azul oscuro. Los lazos aparecen en naranja, salvo el lazo CC', que se muestra coloreado de verde claro. Los residuos de cisteína y los puentes disulfuro se muestran con cilindros en verde. B. Representación de la asociación dimerica de los dominios N-terminales de mTIM-1 y mTIM-2 en las estructuras. Un monómero está representado como en A y el otro aparece coloreado en amarillo.

La resolución de las estructuras cristalográficas de los dominios N-terminales de las proteínas TIM-1 y TIM-2 murinas confirmaron un plegamiento del tipo inmunoglobulina variable (IgV) (129). Los dominios IgV de estas proteínas poseen dos láminas β , la lámina β BED y la lámina β GFC. Las hebras de las láminas β presentan diferencias significativas. Las hebras que forman la lámina β BED son particularmente cortas y están unidas por largos lazos, mientras que en la cara opuesta, las hebras A, G, F, C y C' que forman la lámina β GFC son relativamente más largas. El primer y último residuo de cisteína de este dominio une el sándwich β como ocurre en la mayoría de los dominios tipo Ig. Los otros cuatro residuos extra de cisteína característicos de la familia TIM, forman dos puentes disulfuro externos que unen el largo lazo CC' a la lámina β GFC (Fig. 1.2A). La estructura cristalográfica del dominio N-terminal de mTIM-1 también reveló una interacción homofílica TIM1-TIM1 en *trans* previsiblemente entre proteínas expuestas en la superficie de dos células opuestas. Esta interacción se confirmó mediante experimentos bioquímicos, que demostraron la necesidad de los dominios IgV y mucina para una interacción efectiva. La resolución de la estructura de mTIM-2 mostró que este dominio formaba un dímero en *cis*, probablemente formado entre dos proteínas expuestas

en la misma superficie celular (Fig. 1.2B), tal y como indicaron experimentos bioquímicos (129).

1.2.2. Dominio mucina.

Existen diferencias muy marcadas en la longitud y el número de glicosilaciones de los dominios mucina de las proteínas TIM. Tanto es así, que los sitios potenciales de O-glicosilación de este dominio varían entre 43 en mTIM-4 y 1 en hTIM-3 (74). No está claro cual es la función del dominio mucina. Este dominio puede ser importante para la oligomerización de las proteínas, para la interacción con ligandos o simplemente para presentar el dominio N-terminal a ligandos.

1.2.3. Dominio Citoplasmático.

El dominio citoplasmático de las proteínas TIM es el dominio más conservado entre los ortólogos humano y murino. Su longitud puede variar entre 42 y 77 residuos. El motivo de fosforilación tirosina quinasa que presentan TIM-1 (EDNIYIVED), TIM-2 (EDQVYIIE) y TIM-3 (RSEENIY) está implicado en la transducción de señales al interior celular tras el reconocimiento de ligandos. TIM-4 es la única proteína de la familia que no posee motivo de tirosina quinasa en su dominio citoplasmático. Por lo tanto TIM-4 no transmite señales intracelulares tras la interacción con sus ligandos.

1.3. TIM-1.

1.3.1. Expresión celular y función de TIM-1.

La proteína TIM-1 se expresa en linfocitos T cooperadores $CD4^+$ activados y su expresión pasa a estar restringida a células T del tipo Th2 cuando las células $CD4^+$ se diferencian (91, 103, 151). También se ha observado expresión de TIM-1 en células T NK, en células T reguladoras (Treg), y en menor medida en mastocitos y en células B $CD19^+$ (24, 78, 103, 151, 163).

La función de TIM-1 está relacionada con la activación y proliferación celular, procesos que pueden provocar inflamación de las vías respiratorias y asma. El entrecruzamiento de TIM-1 en la superficie de células T $CD4^+$ mediante anticuerpos monoclonales desencadena una potente señal coestimuladora que conduce a la activación de las células T (CT), a su proliferación y al aumento de la producción de interleucina 4 (IL-4) por parte de las células Th2 (151). El mismo fenómeno se observó en experimentos

in vivo, donde la administración de un anticuerpo contra TIM-1 produjo un aumento de la respuesta inmune mediada por CT, así como inflamación. (138, 151). Por el contrario, la administración de otros anticuerpos contra TIM-1 condujo al desarrollo de tolerancia respiratoria y a una menor inflamación de las vías respiratorias provocada por alérgenos (32, 137, 151). Parece que la administración de anticuerpos contra TIM-1 puede desencadenar dos tipo de respuesta inmune diferentes, del tipo Th1 o del tipo Th2, dependiendo de la afinidad de los anticuerpos y del epítipo que reconocen (167).

El mecanismo molecular por el cual TIM-1 es capaz de estimular a las CT es aún incierto. Sin embargo, varios estudios han demostrado la importancia del motivo tirosina quinasa del dominio citoplasmático de las proteínas TIM para la transducción de señales en el interior celular (23). Estudios realizados en CT mostraron que el entrecruzamiento de TIM-1 con un anticuerpo provoca la fosforilación de la tirosina del dominio citoplasmático de TIM-1, la fosforilación de las proteínas Zap-70 e Itk y el transporte intracelular de la proteína PI3K hacia el receptor celular de células T (TCR). Este estudio también mostró que TIM-1 colocaliza con la proteína CD3 y es transportado intracelularmente junto con el TCR (6).

TIM-1 es sobreexpresada en células epiteliales de riñón tras daño renal agudo. En este caso, una proteasa proteoliza la zona próxima a la membrana de TIM-1, generando una forma soluble que es liberada en la orina. La presencia en orina de esta forma soluble de TIM-1 es usada hoy en clínica como diagnostico de daño renal agudo (83).

1.3.2. Ligandos descritos para TIM-1.

El primer ligando descrito para TIM-1 fue HAV, virus que utiliza esta proteína como receptor celular para unirse e infectar la célula huésped (36, 61). Experimentos con proteínas de fusión que contenían diferentes dominios de TIM-1 concluyeron que los dominios IgV y mucina son necesarios para la infección celular de HAV (134-136). Hasta la fecha se han identificado varios ligandos naturales de TIM-1. Además de ser el receptor de HAV, TIM-1 es capaz de reconocer la cadena pesada de la inmunoglobulina A (IgA) (145) y otros miembros de la familia TIM como TIM-3 (160), TIM-4 (94), o incluso mediar interacciones intercelulares TIM1-TIM1 (129).

1.4. TIM-3.

1.4.1. Expresión celular y función de TIM-3.

TIM-3 se expresa en células Th1 diferenciadas (98, 127) y en células proinflamatorias Th17 humanas y murinas (51, 104). También se expresa en células del sistema inmune innato como mastocitos de ratón, en una subpoblación de macrófagos, células dendríticas, células Natural Killer (NK), células primarias del epitelio bronquial y monocitos humanos (2).

Numerosos trabajos han demostrado que TIM-3 desempeña un papel supresor de la estimulación de células Th1. La caracterización funcional de TIM-3 en la regulación de la respuesta inmune se llevó a cabo mediante experimentos *in vivo* donde se administraron anticuerpos contra TIM-3 durante el transcurso de una enfermedad ligada a linfocitos Th1, la Encefalitis Experimental Autoinmune (EEA). La administración de un anticuerpo monoclonal contra TIM-3 empeoró la progresión de la enfermedad, debido al aumento del número de macrófagos y del estado de activación de éstos (98). Así mismo, la administración de proteínas de fusión que contenían el dominio IgV de TIM-3 durante una respuesta inmune condujo a la hiperproliferación de las células Th1 y a la producción de IFN- γ (126). Estos experimentos sugieren que la interacción de TIM-3 con ligandos conduce a la inhibición de la respuesta Th1 durante una respuesta inmune.

1.4.2. Ligandos descritos para TIM-3.

Para desvelar el mecanismo de actuación de TIM-3 en la regulación de las respuestas inmunes, se llevó a cabo la búsqueda de ligandos. Mediante ensayos de coprecipitación se observó que mTIM-3 interacciona con galectina-9 y que esta interacción conduce a la muerte de las células Th1 y por tanto, a la supresión de la respuesta efectora de los linfocitos Th1 (172). La interacción entre galectina-9 y TIM-3 provoca la fosforilación del motivo tirosina quinasa que presenta TIM-3 en su dominio citoplasmático (153, 172).

Durante el inicio de la respuesta celular, TIM-3 se expresa en células dendríticas CD11c⁺ y promueve procesos inflamatorios junto con los TLRs (Toll Like Receptors) (2). Una vez generada una respuesta Th1 efectora, TIM-3 se expresa en la superficie de células Th1, que activan la producción de galectina-9 mediante la secreción de IFN- γ . La unión de galectina-9 a TIM-3 activa la muerte de las células Th1 y suprime su respuesta efectora (Fig. 1.3). La implicación de la interacción de TIM-3 con galectina-9 en la regulación de

la función de las células Th1, pudo haber surgido para evitar una respuesta excesiva por parte de dichas células y así, prevenir daños tisulares que podrían derivar en patologías inmunes debido a una respuesta Th1 incontrolada, como sucede en EEA. No obstante, TIM-3 no es sólo capaz de inhibir las funciones de las CT mediante la eliminación de las células Th1, sino que también es capaz de inducir tolerancia inmunológica (126, 127). Sin embargo, el mecanismo mediante el cual las CT o las células presentadoras de antígeno (CPA) que expresan TIM-3 son capaces de conducir a la tolerancia inmunológica es aún incierto.

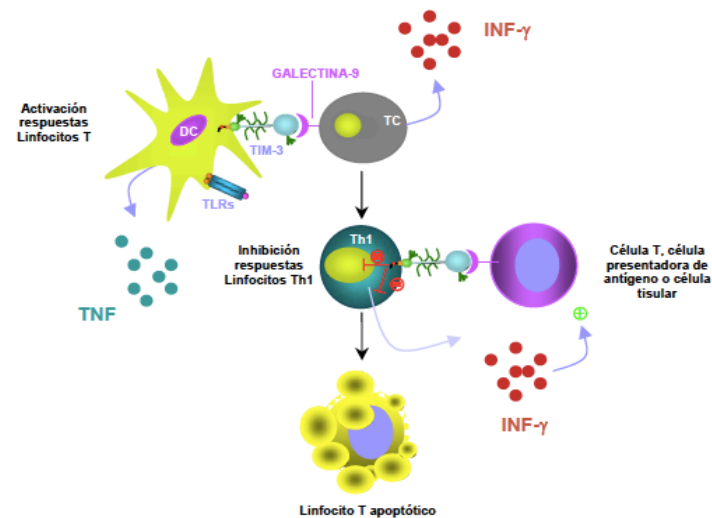


Figura 1.3. Función de TIM-3 en el sistema inmune. En estado de reposo, TIM-3 se expresa fundamentalmente en células dendríticas (DC). La señal de TIM-3 sumada a la producida por los TLRs conlleva a la activación de las DC, a la producción de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF (Tumor necrosis factor) y a la preparación de las células T para su diferenciación. Posteriormente, cuando las células Th1 están totalmente diferenciadas expresan TIM-3 y secretan INF-γ que induce la expresión de galectina-9. La interacción entre la galectina-9 y TIM-3 finaliza la respuesta Th1 inhibiendo la secreción de INF-γ y provocando la apoptosis de células Th1 que expresan TIM-3.

1.5. TIM-4.

1.5.1. Expresión celular y función de TIM-4.

TIM-4 fue identificada de manera independiente a las proteínas TIM como SMUCKLER (spleen, mucin-containing, knockout of linphotoxin), un gen que se inhibía en el bazo de ratones deficientes para Linfotóxina- α y Linfotóxina- β (131). Al contrario que TIM-1 y TIM-3, TIM-4 no se expresa en CT sino en células CPA. El análisis de la expresión de mTIM-4 mostró que el mRNA se expresaba en bazo, nódulos linfáticos y en pulmones, hígado y timo en bajos niveles. En humanos, TIM-4 se expresa en macrófagos CD11b⁺ y CD169⁺ localizados en las amígdalas, en la pulpa blanca y la zona marginal del bazo (120, 131). TIM-4 también se expresa en los subtipos CD8 α ⁺

y CD8 α ⁻ de células dendríticas CD11c⁺, pero no se expresa en las células dendríticas plasmocitoides (70).

Ya que TIM-1 y TIM-3 desempeñan funciones relacionadas con la regulación de la respuesta inmune mediada por CT, se realizaron varios trabajos para determinar si TIM-4 tenía un papel similar. Se administró *in vivo* mTIM-4 soluble a ratones durante la activación de CT para observar que ocurría cuando se bloqueaba ligando natural de TIM-4. Al analizar las reacciones celulares tras la administración de la proteína TIM-4 soluble en ratones, se observó que dicha respuesta era dependiente de la concentración de proteína soluble utilizada. (94). A altas concentraciones de proteína se estimulaba la proliferación celular, mientras que cuando se administraba una cantidad baja de mTIM-4 se inhibía la proliferación de CT. Por tanto, dependiendo de la cantidad de proteína administrada en el ensayo, se producirá un efecto de activación celular o de inhibición de la actividad celular, efecto similar al observado en los experimentos con anticuerpos contra mTIM-1 (94).

1.5.2. Ligandos descritos para TIM-4.

Mediante citometría de flujo se realizó una búsqueda de posibles ligandos naturales de TIM-4 en esplenocitos murinos. Para ello, se utilizó una proteína mTIM-4 recombinante fusionada a la región Fc de la proteína IgG1 humana (mTIM4-Fc) (94). De este modo, se detectó un ligando de mTIM-4 en células B activadas, así como en la mayoría de las CT activadas, preferentemente en células Th2. Debido a que el patrón de expresión de TIM-4 era distinto al del resto de proteínas de la familia, se analizó la posibilidad de que existiera una interacción con otra proteína de la familia TIM. Se detectó que mTIM-4 interaccionaba con mTIM-1, pero no con mTIM-2 o mTIM-3 y que dicha interacción inducía la proliferación de CT. Así mismo, se demostró que esta interacción era específica mediante el boqueo de la misma con anticuerpos específicos para mTIM-1 (94).

1.6. TIM-2.

1.6.1. Expresión celular y función de TIM-2.

TIM-2 es la única familia de las proteínas TIM que está presente solamente en ratón. Se cree que se originó como consecuencia de una duplicación génica del gen de TIM-1 en ratones. La expresión de TIM-2 no ha sido detectada en CT vírgenes, aunque se expresa moderadamente en CT activadas, especialmente en células Th2 (16). TIM-2 también se

expresa en las células B de los centros germinales de los ganglios y del bazo (17). Así mismo, TIM-2 también ha sido detectada en tejidos no inmunitarios como el hígado o las células epiteliales de los túbulos renales (17).

Las principales funciones biológicas que se le han atribuido a mTIM-2 *in vitro*, son la activación y diferenciación de CT, mientras que *in vivo* induce la formación de CT específicas de antígeno (16).

1.6.2. Ligandos descritos para TIM-2.

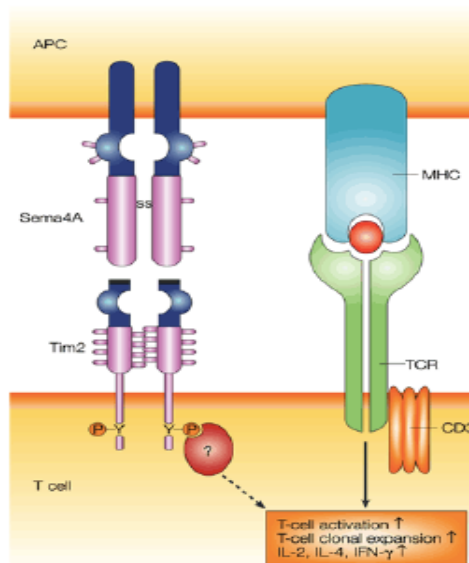
La identificación de ligandos de mTIM-2 se llevó a cabo siguiendo la misma estrategia que para TIM-4, usando una proteína mTIM-2 recombinante fusionada a la región Fc de la proteína IgG1 humana (mTIM2-Fc). Con esta herramienta se detectó la presencia de ligandos sobre la superficie de CPA. El primer ligando de mTIM-2 descubierto fue la semaforina 4A (Sema4A), proteína expresada en la superficie células B, macrófagos y células dendríticas (75). La interacción descrita entre Sema4A y mTIM-2 en CT activadas origina la fosforilación del motivo tirosina quinasa que posee mTIM-2 en su dominio citoplasmático (Fig. 1.4) (75). El bloqueo de esta interacción con la proteína soluble mTIM-2-Fc provoca un aumento de la respuesta Th2 y una inhibición de la respuesta Th1. Los datos obtenidos con ratones deficientes para Sema4A y con anticuerpos bloqueantes, corroboran el papel de mTIM-2 en la inhibición de respuestas inmunes tipo Th2 (122).

También se ha descrito la interacción de mTIM-2 con H-ferritina, una molécula implicada en procesos de inactivación de especies oxigenadas con alta reactividad, así como en procesos de inmunosupresión. La unión específica de H-ferritina a mTIM-2 en la superficie celular provoca su internalización a través de endosomas, por lo que TIM-2 podría formar parte del proceso de regulación de los niveles de H-ferritina circulante (17, 149).

La dimerización descrita para el dominio N-terminal de mTIM-2 (Fig. 1.2B), debe de ser responsable de la unión específica de esta proteína con Sema4A y H-ferritina, ligandos no reconocidos por otras proteínas de la familia TIM, que al contrario que mTIM-2 no forman dímeros en *cis* (129).

Figura 1.4. Interacción de mTIM-2 con Sema4A y efectos celulares.

La semaforina 4A (Sema 4A) contiene un dominio sema de 500 aminoácidos, un dominio inmunoglobulina, transmembrana y dominio citoplasmático. Se expresa en forma de dímero covalente en la superficie de células presentadoras de antígeno (APC). La señalización a través del receptor de células T (TCR) tras su interacción con el Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) induce la expresión de mTIM-2 en células T. La interacción de Sema4A y mTIM-2, cuyo dominio citoplasmático se fosforila e interacciona con moléculas todavía desconocidas, produce un aumento en la activación de células T, con un incremento en la producción de citoquinas IL-2, IL-4, IFN- γ y en su expansión celular.



1.7. Polimorfismos descritos en las proteínas TIM.

Los genes de las proteínas TIM se identificaron mediante experimentos de clonaje posicional en ratones subcongénicos BALB/c-HBA resistentes a AHR (hiperreactividad en las vías respiratorias). Los ratones BALB/c se caracterizan por desarrollar respuestas inmunes del tipo Th2 y una elevada predisposición al desarrollo de AHR, mientras que los ratones HBA presentan una baja predisposición a desarrollar AHR (43). La búsqueda de los genes relacionados con la inhibición de la respuesta inmune Th2 en ratones HBA, condujo a la identificación de los genes TIM. La comparación de las secuencias de las regiones codificantes para los genes TIM de los ratones BALB/c y HBA, permitió la caracterización de varios polimorfismos génicos para TIM-1 y TIM-3 (91). Al contrario que los otros miembros de la familia, mTIM-2 no presenta variantes polimórficas entre las cepas BALB/c y HBA, por lo que esta proteína no debe tener ninguna influencia sobre las diferencias fenotípicas de dichas cepas.

TIM-1 es uno de los genes más polimórficos de la región Tapr del cromosoma humano 5q33. Los polimorfismos en la proteína TIM-1 humana y murina consisten principalmente en inserciones/delecciones en el dominio de mucina. Sin embargo, los polimorfismos de los homólogos humano y murino de TIM-3 están localizados exclusivamente en el dominio IgV (Fig. 1.5).

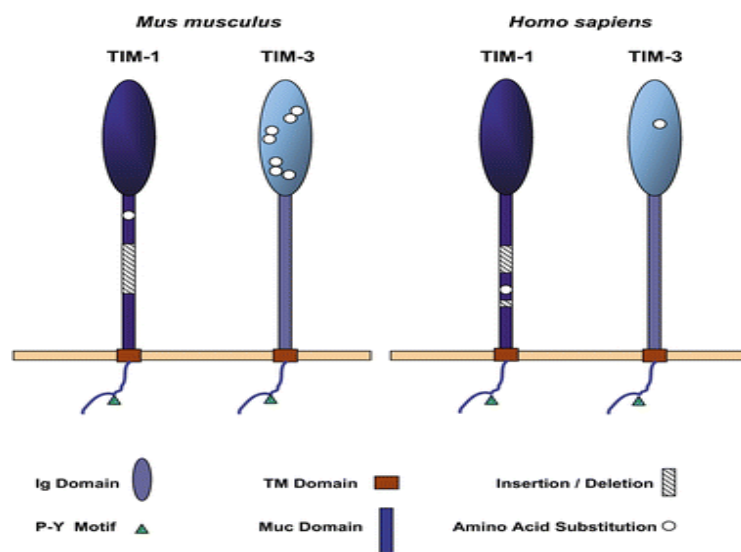


Figura 1.5. Localización de los polimorfismos en las proteínas TIM- 1 (azul) y TIM-3 (cian) humanas y murinas. El dominio IgV se muestra representado como un óvalo, mientras que el dominio mucina aparece como un rectángulo del mismo color. El dominio transmembrana se muestra coloreado de rojo. El motivo de fosforilación tirosina quinasa aparece señalado con un triángulo verde. Los polimorfismos aparecen señalados como esferas blancas, mientras que las inserciones/delecciones se muestran como rectángulos rayados.

1.7.1. Polimorfismos de TIM-1.

Las enfermedades atópicas como el asma, la dermatitis atópica y la rinitis alérgica, son enfermedades complejas, ya que su aparición está condicionada tanto por factores ambientales como por factores genéticos. Las proteínas TIM están situadas en un locus génico relacionado con estas enfermedades, por lo que podrían estar implicadas en el desarrollo de las mismas. TIM-1 es un gen altamente polimórfico, por lo que estos polimorfismos podrían estar relacionados con las diferencias en la susceptibilidad a atopía y asma en humanos (91). Por otra parte, hTIM-1 es el receptor celular de HAV, y la interacción de HAV con una variante concreta de hTIM-1 podría condicionar la respuesta de las CT, otorgando una protección frente al desarrollo de enfermedades atópicas (35). Por todo esto, se han realizado numerosos estudios epidemiológicos para establecer una relación entre las enfermedades atópicas y los polimorfismos génicos de TIM-1 en humanos (Fig. 1.6). El primer estudio que reveló consecuencias funcionales de los polimorfismos en TIM-1 humano fue publicado en el año 2003. En este trabajo, los autores mostraron que la inserción 157insMTTTPV, y la mutación 195delT estaban asociadas con protección a enfermedades atópicas, pero sólo en individuos seropositivos para HAV (92). La inserción 157insMTTTPV está localizada en el dominio mucina de hTIM-1 y provoca un alargamiento significativo de dicho dominio (12-14%). Así mismo, en la proteína mTIM-1 encontramos una inserción/delección en el dominio mucina, en este caso de 15 aminoácidos (91). Se han realizado numerosos trabajos en diferentes poblaciones, con el objetivo de identificar polimorfismos adicionales de hTIM-1, con

especial interés en aquellos presentes en el dominio mucina (15, 41, 81, 100, 105, 165, 166). Los datos epidemiológicos obtenidos, muestran una conexión entre los polimorfismos presentes en el dominio mucina de hTIM-1 y la predisposición a enfermedades atópicas en algunas, pero no todas, las poblaciones examinadas.

Los polimorfismos de hTIM-1 no sólo se han asociado con asma y alergias, sino que también están implicados en diferentes enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide (13), esclerosis múltiple (65) y lupus (82). Estudios recientes han mostrado una asociación entre los polimorfismos de hTIM-1 y enfermedades como malaria cerebral (109) y VIH (159). Lo que indica que TIM-1 desempeña un papel más complejo en la regulación del sistema inmune, posiblemente como consecuencia de su función en el mantenimiento del balance de la respuesta inmune Th1/Th2.

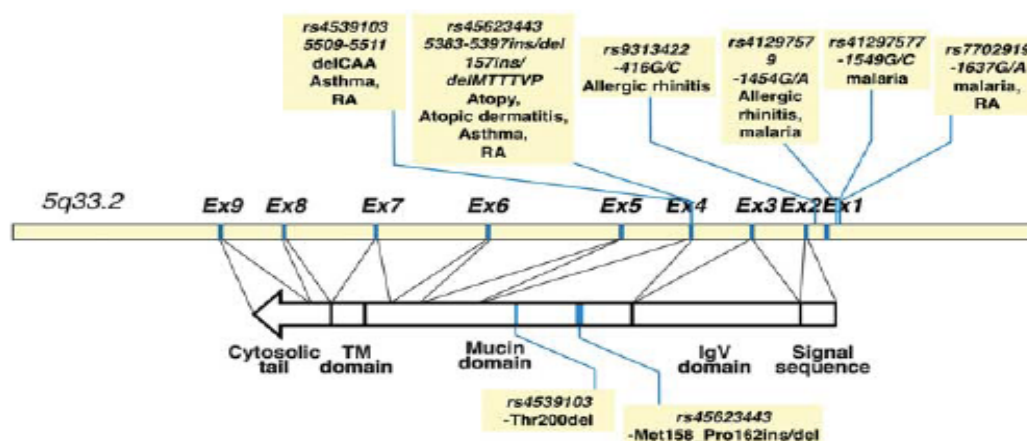


Figura 1.6. Esquema de la localización genómica y proteómica de los polimorfismos de hTIM-1 y las enfermedades asociadas con dichos polimorfismos.

1.7.2. Polimorfismos de TIM-3.

Los polimorfismos identificados para la proteína TIM-3 murina consisten en siete sustituciones de aminoácidos que se encuentran localizados en el dominio IgV, concretamente cuatro de ellos en la hebra A y tres en el lazo BC (Fig. 1.7) (91). Sin embargo, a nivel proteico tan sólo se han identificado polimorfismos presentes en el dominio mucina de hTIM-3.

TIM-3		Hebra A	Lazo BC							
1	MFSG	LTLCVLLLLQ	LLARSLE	NAYVEVGK	NAYLPCSYTLSTGALVPMCWGKGFC	PWSQCTNELLRTDERNVTYQKSSRYQLKGD	LNKGDVSLI	IKN	HBA	
1	MFSG	LTLCVLLLLQ	LLARSLE	NAYVEVGK	NAYLPCSYTLSTGALVPMCWGKGFC	PWSQCTNELLRTDERNVTYQKSSRYQLKGD	LNKGDVSLI	IKN	BALB/c	
100	VTLD	DHGTCCRIQ	FPGLMNDKKLE	LKLDIAAKVTPAQ	TAHGDSTTASPTLT	TTERNGETQT	LVTLHNNNGTKIST	WADEIKDSGET	IRTAIHIGVGV	HBA
100	VTLD	DHGTCCRIQ	FPGLMNDKKLE	LKLDIAAKVTPAQ	TAHGDSTTASPTLT	TTERNGETQT	LVTLHNNNGTKIST	WADEIKDSGET	IRTAIHIGVGV	BALB/c
200	SAGL	TALIIIGVL	ILKWYSCKKKL	SSLSLITLANL	PPGGLANAGAVR	IRSEENIYTI	EENVYEVENS	NEYCYVNS	QQPS	HBA
200	SAGL	TALIIIGVL	ILKWYSCKKKL	SSLSLITLANL	PPGGLANAGAVR	IRSEENIYTI	EENVYEVENS	NEYCYVNS	QQPS	BALB/c

Figura 1.7. Alineamiento de secuencias de las dos variantes polimórficas HBA y BALB/c de mTIM-3.
Los residuos polimórficos de la hebra β A y del lazo BC aparecen coloreados en azul.

Los polimorfismos presentes en la proteína TIM-3 humana han sido relacionados con la susceptibilidad a enfermedades atópicas en numerosos estudios (Fig. 1.8) (13, 14, 45). Por el contrario, en otros estudios no se encontró ninguna evidencia sobre la relación entre dichos polimorfismos y las enfermedades atópicas (41, 166). Por lo tanto, con los estudios realizados hasta la fecha es aún prematuro generalizar sobre la relación directa de los polimorfismos de TIM-3 y la rinitis alérgica o el asma.

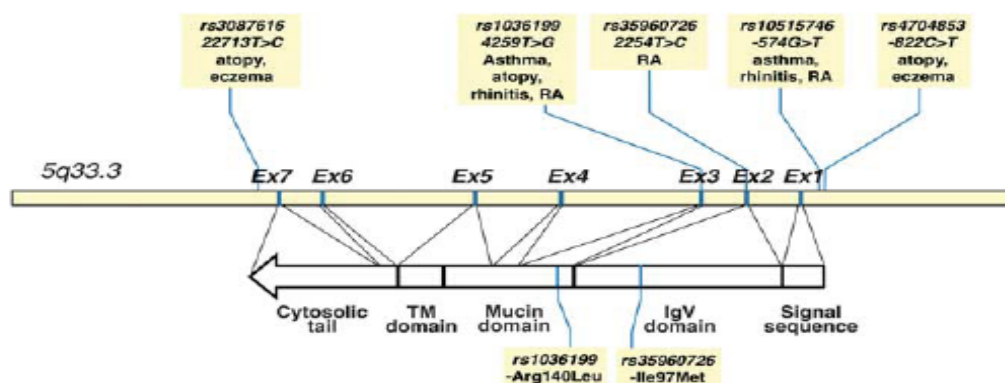


Figura 1.8. Esquema de la localización genómica y proteómica de los polimorfismos de hTIM-3 y las enfermedades asociadas.

1.8. La fosfatidilserina.

La fosfatidilserina (FS) es un glicerofosfolípido compuesto por una molécula de glicerol con dos cadenas acilo en las posiciones sn-1 y sn-2, y una cabeza polar en la posición sn-3 formada por un fosfato y un molécula de serina (Fig. 1.9). Mientras que los fosfolípidos fosfatilcolina (FC) y fosfatidiletanolamina (PE) son fosfolípidos zwitteriónicos, la FS es aniónico (Fig. 1.8). Por lo tanto, cuando la FS está presente en cantidades relativamente altas en una membrana, ésta adquiere un potencial

electronegativo, de manera que cationes solubles y proteínas cargadas positivamente son capaces de unirse a la superficie electronegativa generada (140).

La FS es el fosfolípido cargado negativamente más abundante en membranas eucariotas, aunque sólo representa el 7% del total de lípidos celulares. A pesar de que su presencia en las membranas celulares es escasa, esta molécula tiene una gran importancia fisiológica debida a sus propiedades físicas y bioquímicas únicas. La FS es una molécula clave para el reclutamiento y la activación de numerosas enzimas y componentes estructurales, y sirve de molécula señal de importantes eventos como la hemostasis o la eliminación de células apoptóticas (80).

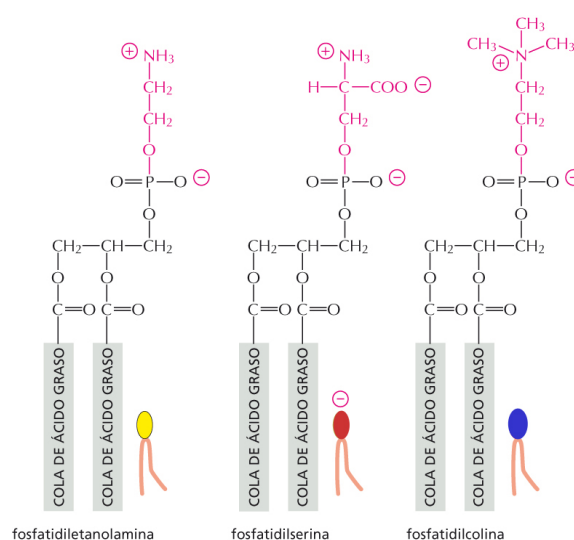


Figura 1.9. Representación esquemática de la fosfatidilserina (FS), fosfatidiletanolamina (FE) y fosfatidilcolina (FC). Las cabezas polares de dichos fosfolípidos se muestran en rosa, el grupo fosfato y el glicerol aparecen en negro. Las cadenas de ácido graso de muestran señaladas en negro y subrayadas en gris. Al lado de cada fosfolípido aparece un dibujo de los mismos con la cabeza polar amarilla para la FE, roja para la FS y azul para la FC. El único fosfolípido cargado es la FS, que presente carga negativa.

La fosfatidilserina es un fosfolípido cuya localización está restringida a la cara interna de la membrana celular. Esta localización celular está determinada por una compleja maquinaria celular que mantiene y genera cierta simetría en la membrana plasmática. Cuando la célula se encuentra en estado de reposo, una aminofosfolípido translocasa con actividad ATPasa dependiente de magnesio se encarga de transportar las moléculas de FS desde la cara externa de la membrana plasmática a la cara interna (Fig. 1.9) (31). En cambio, cuando la célula entra en muerte celular o apoptosis se pierde la simetría de la membrana plasmática y la FS queda expuesta en la cara externa de la membrana (152). Durante el proceso de apoptosis, además de la inhibición de la proteína aminofosfolípido translocasa, se produce la activación dependiente de calcio de una escramblasa encargada de transportar inespecíficamente fosfolípidos bidireccionalmente de una cara a otra de la membrana celular (Fig. 1.10) (162).

Los proceso de apoptosis y de activación celular conducen al aumento de la concentración de calcio intracelular. Estudios de activación de CT mostraron que el

aumento intracelular de calcio también provoca la inducción de la proteína escramblasa y la pérdida de la asimetría de los fosfolípidos de la membrana celular (161). En CT humanas CD8⁺ la exposición de FS en la superficie celular está relacionada con la activación celular y se produce tras el reconocimiento de antígeno por el TCR (37).

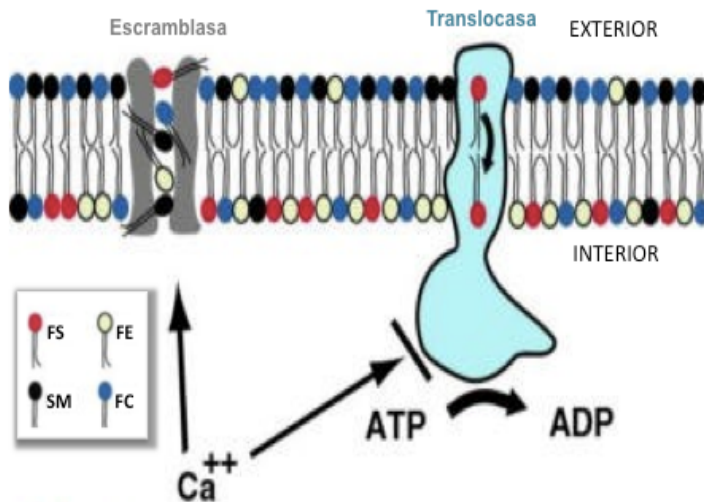


Figura 1.10. Mecanismo de exposición de las moléculas de FS en el exterior de la membrana plasmática celular. Durante los procesos de apoptosis o activación celular se produce un aumento de la concentración de calcio intracelular. Este aumento de calcio provoca la inhibición de la aminofosfolípido translocasa y la activación de la escramblasa, lo que conduce a la pérdida de la simetría de la membrana y la exposición de moléculas de FS en la cara externa de la membrana celular. Los fosfolípidos mayoritarios en las membranas celulares se representan con sus cabeza polares en diferentes colores, la FS en rojo, la FE en amarillo, la FC en azul y la esfingomielina (SM) en negro.

El proceso de externalización de moléculas de FS en la membrana celular no está restringido a células apoptóticas y CT activadas, sino que también se ha descrito en diferentes tipos celulares como plaquetas (4), neutrófilos (39), células B (29), eritrocitos (25), mastocitos (62) y células linfoides (161). Por ejemplo, durante la hemostasis o el proceso de coagulación sanguínea, la FS se expone en la superficie de las plaquetas tras su activación. En este proceso la FS actúa como molécula señal en la cascada de coagulación, desencadenando la unión y activación de numerosos factores de coagulación como los factores V, VIII, X y protrombina (86, 140). Estas proteínas se unen a la FS expuesta en la superficie de plaquetas de una manera selectiva y estereoespecífica, de la que hablaremos más adelante.

La FS también se encuentra expuesta en la superficie de exosomas producidos por células de mamífero (148). La secreción de exosomas tardíos es un proceso común y específico de CT activadas, pero no se ha observado cuando estas células se encuentran en un estado de reposo (38). Durante el proceso de externalización de exosomas se produce la fusión de estos con la membrana plasmática celular, proceso que provoca también la exposición de moléculas de FS en la superficie celular.

1.9. Receptores de FS.

1.9.1. Receptores intracelulares de FS.

La molécula de FS presente en la cara interna de la membrana plasmática sirve como molécula de anclaje para proteínas de señalización celular, como la proteína quinasa C (PKC) o la anexina V. La PKC es una quinasa localizada en el citosol capaz de translocarse a la cara interna de la membrana plasmática. La especificidad que esta proteína presenta por la molécula de FS depende de isoforma. Así, las isoformas clásicas, α y β , se unen a FS mediante un dominio tipo C2 de manera estereoespecífica y dependiente de calcio (156). Dos lazos presentes en el dominio C2 son los responsables de la unión de los cationes calcio y la molécula de FS. Uno de estos lazos presenta residuos básicos y ácidos responsables de la coordinación del catión de calcio y la unión selectiva del enantiómero L de la FS. Otro de los lazos posee residuos hidrofóbicos, que podrían penetrar en la membrana celular cuando la proteína esta unida a la FS (Fig. 1.11) (156). Se han descrito otras proteínas que unen FS mediante dominios C2, pero la presencia de dominios C2 no garantiza en todos los casos una unión selectiva a FS (107, 142).

Las anexinas son una familia de unas 20 proteínas intracelulares capaces de unirse a la membrana celular en respuesta a cambios en la concentración de calcio intracelular. La mayoría de las anexinas interaccionan con fosfolípidos ácidos en general, aunque algunas de ellas presentan especificidad por un fosfolípido determinado, como es el caso de la anexina V por FS. Gracias a esta unión específica a FS, la anexina V es utilizada comúnmente para la identificación de células apoptóticas mediante técnicas de citometría de flujo (170). La anexina V tan sólo contiene un núcleo anexina formado por 4 repeticiones de unos 7-40 aminoácidos llamadas "repeticiones anexina" (140). Los residuos polares presentes en los lazos del núcleo anexina son los encargados de la interacción con la molécula de FS. Estos residuos forman un enlace de puente de hidrógeno con la serina de la FS y coordinan un átomo de calcio. Este mismo lazo también presenta un residuo hidrofóbico de triptófano que es capaz de interaccionar directamente con la membrana celular (Fig. 1.11) (143). Sin embargo, la interacción mediada por los átomos de calcio entre el núcleo anexina y las moléculas de FS es la responsable de la asociación a la membrana.

1.9.2. Receptores extracelulares de FS.

Cuando la molécula de FS se expone en la superficie de células apoptóticas o activadas, ésta actúa como una molécula señal reconocida por receptores extracelulares y que desencadenan diferentes tipos de respuesta celular, como procesos de coagulación sanguínea o de eliminación de células apoptóticas.

1.9.2.1. Factores de coagulación sanguínea.

La unión de varios factores de coagulación sobre la membrana celular conlleva a la aparición de grandes agregados proteicos que inician cascadas de activación celular. Los factores VII, IX, X y la protrombina contienen un dominio N-terminal tipo Gla, que tienen una alta afinidad por FS. Los dominios Gla (ácido glutámico γ -carboxilado) son unos dominios pequeños de unos 40 aminoácidos que contienen de 9 a 12 residuos de ácido glutámico γ -carboxilado. La carboxilación es dependiente de vitamina K y hace posible la coordinación de cationes calcio y la unión de la molécula de FS (54). La estructura cristalográfica de la protrombina unida a FS, mostró un posible cambio conformacional producido por la unión a cationes calcio (Fig. 1.11). Este cambio conformacional expone un grupo de residuos hidrofóbicos, de manera que estos residuos son capaces de interaccionar con la membrana celular e insertarse en ella (139). No obstante, la especificidad de la interacción está determinada por la coordinación del catión calcio con la cabeza polar de la FS y los residuos de Gla proteicos. A pesar de que se ha descrito la unión específica de protrombina a FS, parece que los dominios Gla presentan una especificidad por fosfolípidos aniónicos, más que por la propia molécula de FS (42).

Otros factores de coagulación como el factor V y el VIII se unen a FS mediante otro tipo de dominios, los dominios C2 discoidina (Fig. 1.11) (85, 87, 119). La especificidad por FS que presenta este tipo de dominios es mayor que la de los dominios tipo Gla. Tanto es así, que los dominios C2 presentan una unión estereoselectiva por el enantiómero L de la molécula de FS. Además, estos dominios no requieren de calcio o de vitamina K para su unión a FS. Varios lazos del dominio C2 discoidina del factor de coagulación V, contienen aminoácidos básicos responsables de la unión específica a FS. Estos lazos también presentan varios residuos hidrofóbicos, que podrían establecer interacciones adicionales con la membrana y penetrar en ella (Fig. 1.11) (87).

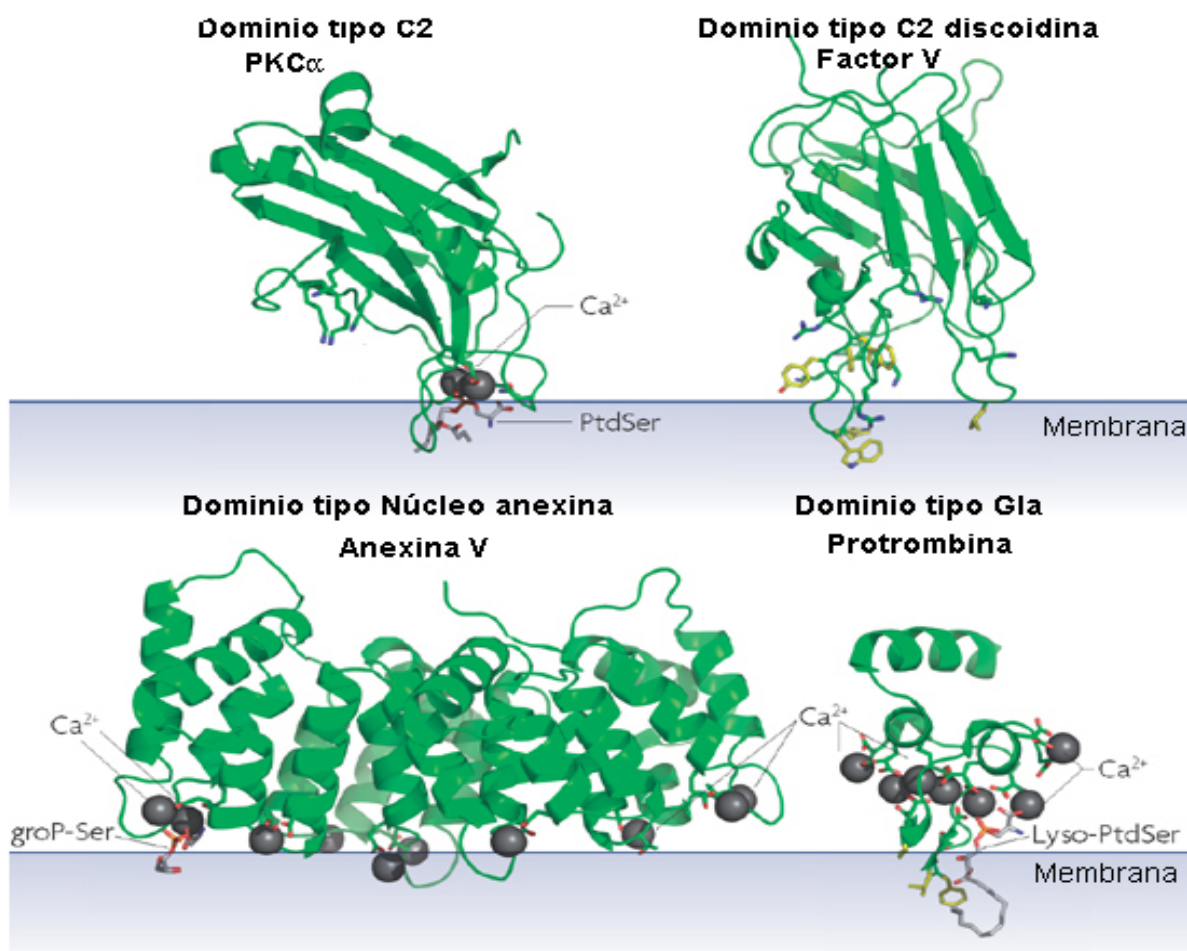


Figura 1.11. Proteínas y dominios de unión a FS. La estructura de las proteínas PKC α (PDB ID 1DSY), Anexin V (PDB ID 1A8A), Factor V (PDB ID 1CZS) y protrombina (PDB ID 1NL2) están representadas en modelo tipo lazos ("ribbon") en color verde. Aparecen señalados los dominios de unión a FS que presentan dichas proteínas. Los átomos de calcio se muestran como esferas grises. La molécula de FS aparece representada en modelo de barras con los carbonos en gris, los nitrógenos en azul, los oxígenos en rojo y el grupo fosfato en naranja. Aparece señalada la que sería una hipotética membrana celular como una línea azul y una zona difuminada del mismo color.

1.9.2.2. Receptores de FS expuesta en células apoptóticas.

Hasta la fecha se han descrito dos tipos diferentes de moléculas capaces de unir FS expuesta en la cara externa de la membrana plasmática de células apoptóticas: Moléculas solubles, como las proteínas MFG-E8, Gas-6 y la proteína S o receptores celulares que unen FS de manera directa, como la proteína estabilina-2 y BAI1 (Fig. 1.12) (102).

La proteína MFG-E8 o lactadherina es una proteína secretada por células epiteliales mamarias, macrófagos y varios tipos de células dendríticas inmaduras. MFG-E8 actúa como molécula puente entre la FS presente en la superficie de células apoptóticas y receptores celulares de la familia de las integrinas, como $\alpha_v\beta_3$ o $\alpha_v\beta_5$ (48, 168). MFG-E8 contiene varios motivos tipo RGD (Arg-Gly-Asp) reconocidos por integrinas y un motivo

de unión a FS independiente de calcio del tipo C2 discoidina, similar al descrito para el factor de coagulación V (132).

Gas-6 y la proteína S, dos proteínas abundantes en plasma y descritas como ligandos de la familia de receptores TAM (Tyro 3, Axl, y Mer). La familia de receptores tirosina quinasa TAM esta compuesta por las proteínas Tyro3, Axl y Mer. Estas proteínas y sus receptores, Gas-6 y la proteína S, son fundamentales para la fagocitosis de células apoptóticas en los sistemas inmune, nervioso y reproductivo de un individuo adulto (125). Además de jugar un papel importante en la eliminación de células apoptóticas, los receptores de la familia TAM desencadenan señales antiinflamatorias o inmunosupresoras, reguladoras de la respuesta inmune innata (124). La proteína Gas-6 y la proteína S se unen a la molécula de FS mediante un dominio tipo Gla, similar al descrito para los factores de coagulación VII, IX, X y la protrombina.

En el año 2007, Park y colaboradores identificaron a la proteína BAI1 como receptor celular de FS. BAI1 es una proteína transmembrana que une FS y otros fosfolípidos mediante repeticiones de trombospondina tipo 1 (TSP) e interacciona con el transductor de señales citoplasmático ELMO (111). Sin embargo, su papel como receptor de FS se ve muy limitado por su expresión altamente específica en células neuronales (99). Otro candidato a receptor de fosfatidilserina, el receptor estabilina-2, también conocido como HARE (hyaluronic acid receptor for endocytosis), fue descrito en el año 2008 por el mismo grupo de investigación. La estabilina-2 es una proteína de membrana tipo 1 expresada en células del endotelio sinusoidal del bazo, en los nódulos linfáticos y en la médula ósea. Esta proteína desempeña una función clave en la regulación de la viscosidad sanguínea como receptor de ácidos hialurónicos y heparina (50, 108). La estabilina-2 presenta dominios tipo EGF (Epidermal Growth Factor), mediante los que se une a moléculas de FS expuestas en la superficie de células apoptóticas, lo que conduce a su eliminación por fagocitosis. Aunque se sabe que la unión de estabilina-2 a FS es dependiente de calcio, no existen datos estructurales que nos permitan conocer con detalle esta interacción (112).

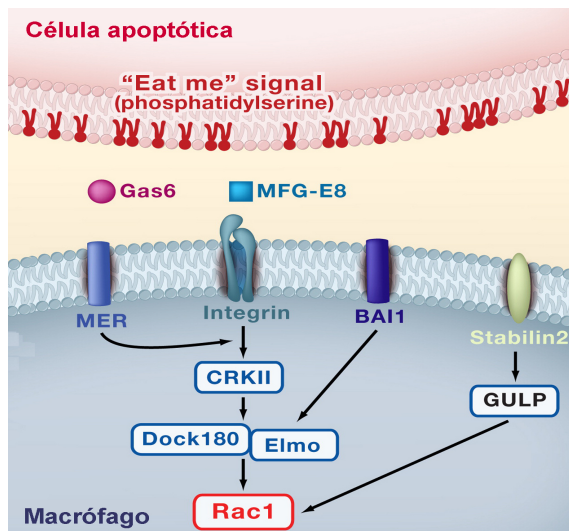


Figura 1.12. Receptores de FS expuesta en la superficie de células apoptóticas (señal "eat me"). En la figura se muestran las proteínas solubles de unión a FS, MFG-E8 y Gas-6, que actúan como moléculas puente entre la FS y proteínas de membrana como integrinas o la proteína MER. También se muestran los receptores celulares de FS BAI1 y estabilina-2 (stabilin-2). Estos receptores celulares son capaces de iniciar la vía de activación de Rac1 (CrkII, Dock180, Elmo, and GULP), que conduce a la fagocitosis de células apoptóticas.

Las proteínas de unión a FS tienden a presentar cierta promiscuidad por los fosfolípidos aniónicos en general. Sin embargo, estas proteínas necesitan interactuar con FS para realizar su función. No obstante, la mayoría de los dominios proteicos que reconocen FS presentan características estructurales similares. Contienen varios residuos cargados positivamente, que interactúan electrostáticamente con la cabeza polar de la molécula de FS. Además, en las interacciones descritas se ha planteado la posibilidad de que la cadena lateral de uno o varios residuos hidrofóbicos expuestos establezcan interacciones adicionales y penetren en la membrana celular.

1.10. Eliminación de células apoptóticas o fagocitosis.

Billones de células son generadas y eliminadas todos los días en nuestro organismo, ya sea por procesos naturales de desarrollo o por procesos relacionados con la eliminación de células infectadas o dañadas. La muerte celular que ocurre de manera fisiológica en el organismo es una muerte celular concertada o programada y se denomina apoptosis (72).

Las células apoptóticas son rápidamente reconocidas y eliminadas del organismo por células especializadas mediante el proceso de fagocitosis. La fagocitosis de células apoptóticas es un proceso desempeñado tanto por macrófagos y células dendríticas, consideradas células fagocíticas profesionales, como por células consideradas no profesionales, entre las que se incluyen células epiteliales, endoteliales y fibroblásticas. Aunque el proceso de fagocitosis es similar en ambos casos, se ha observado que la cinética es diferente. Las células fagocíticas profesionales están más capacitadas para

eliminar células apoptóticas y por lo tanto, realizan el proceso a una mayor velocidad (113).

En las primeras etapas del proceso de apoptosis, las células apoptóticas secretan señales llamadas "find me" (Fig. 1.13). Estas señales actúan como quimioatrayentes, de manera que las células fagocíticas migran a la proximidad de las células apoptóticas (46, 77, 150). Además de facilitar su localización por parte de los fagocitos, las células apoptóticas exponen en su superficie señales de eliminación llamadas "eat me". Estas señales son reconocidas por receptores presentes en las células fagocíticas, de manera que se establece un contacto físico directo entre ambas células que conduce a la fagocitosis de la célula apoptótica. Los macrófagos sólo eliminan las células apoptóticas, por lo que han de ser capaces de discriminar entre una célula apoptótica y una sana. Para ello, las células apoptóticas deben expresar en su superficie señales "eat me", o por el contrario, las células sanas deben expresar señales de no eliminación o "don't eat me" (69). La señal "eat me" mejor conocida y estudiada hasta la fecha es sin duda, la FS, que se expone en la cara externa de la membrana celular cuando una célula entra en apoptosis. Además de los receptores de reconocimiento de las señales "eat me", existe otro tipo de receptores denominados "tethering", como CD14 y CD31, que contribuyen a la estabilización de la unión entre ambas células (8, 28, 53).

El reconocimiento de la molécula de FS expuesta en la superficie de la célula apoptótica por parte de un receptor presente en la célula fagocítica puede desencadenar una cascada de señalización intracelular, que provoca la activación de la pequeña GTPasa Rac1. Esta activación desencadena la reorganización de la membrana plasmática y el citoesqueleto celular, lo que permite que la célula apoptótica sea engullida (47). Una vez ingerida, la célula fagocitada es procesada para su degradación mediante la vía fagosomal. Esta vía comparte etapas con la maquinaria celular endocítica, lo que dificulta distinguir ambos procesos a la hora de estudiar las enfermedades producidas por defectos en las rutas de degradación celular (68).

1.11. Consecuencias en el sistema inmune del fallo en la eliminación de células apoptóticas.

Los fagocitos juegan un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis mediante la eliminación de células apoptóticas. El mantenimiento de la homeostasis se produce como resultado de dos procesos; por un lado, la eliminación de células muertas evita que éstas se vuelvan necróticas y se produzca la liberación de contenido intracelular tóxico o inmunogénico al organismo. Por otro lado, los fagocitos suprimen la inflamación y facilitan el silenciamiento inmunológico, gracias a la producción de citoquinas antiinflamatorias y la inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias. Por lo tanto, se genera un entorno de inmunosupresión en los tejidos, que inhibe el reclutamiento de otros macrófagos y el desarrollo de una respuesta inmune inflamatoria (Fig. 1.13) (34, 141, 158). Por el contrario, si las células apoptóticas no son fagocitadas y eliminadas del organismo con rapidez, éstas pierden la integridad de su membrana y pasan a un estado de necrosis celular, liberando su contenido en el organismo y provocando una respuesta inflamatoria (Fig. 1.14). El estado de inflamación permanente suele venir acompañado de daño tisular, provocando la aparición de numerosas patologías como Lupus eritematoso sistémico (SLE), artritis reumatoide, fibrosis cística, obstrucción pulmonar crónica y diabetes (102).

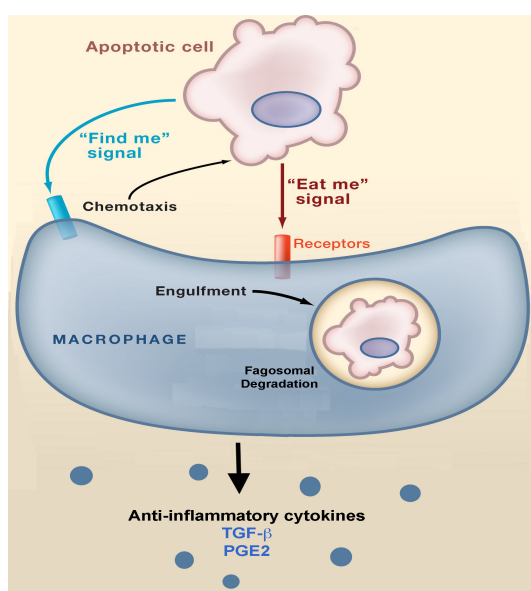


Figura 1.13. Proceso de fagocitosis de células apoptóticas por macrófagos.

Cuando una célula entra en proceso de apoptosis secreta señales "find me" que actúan como quimioatrayentes y a su vez exponen en su superficie señales "eat me". En respuesta a las señales "find me", los macrófagos encuentran a la célula apoptótica y proceden a su fagocitosis mediante el reconocimiento de las señales "eat me". Las células fagocitadas son transferidas a fagosomas donde se procede a su degradación. La fagocitosis de células apoptóticas induce en los macrófagos la secreción de citoquinas proinflamatorias, como el factor de crecimiento transformante (TGF- β) y, la prostaglandina E2 (PGE2).

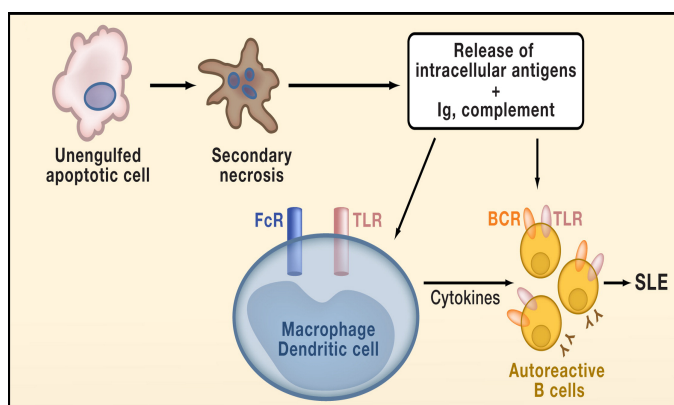


Figura 1.14. Activación del sistema inmune provocada por el defecto en la eliminación de células apoptóticas. Si las células apoptóticas no son eliminadas entran en un estado de necrosis, que produce la liberación del contenido celular. Los antígenos, inmunoglobulinas (Ig) y proteínas del complemento liberadas se unen a receptores celulares (FcR, TLR o BCR), provocando la activación de macrófagos y células dendríticas. Estas células activadas producen citoquinas que estimulan la producción de autoanticuerpos por células B, lo que conduce a patologías autoinmunes como el Lupus eritematoso sistémico (SLE).

Entre todas las consecuencias que puede desencadenar una disfunción en la eliminación de células apoptóticas, las más estudiadas han sido las relacionadas con la función del sistema inmunológico (115). Varios estudios sugieren una fuerte relación entre el proceso de apoptosis y la autoinmunidad, ya sea debido a un proceso no efectivo de apoptosis o a un fallo en la eliminación de las células apoptóticas (84). La administración de células apoptóticas sinérgicas o el enmascaramiento de la molécula de FS mediante su bloqueo con anexina V, conduce al desarrollo de autoinmunidad mediante la producción de autoanticuerpos y la deposición de moléculas de IgG en el glomérulo (3, 93). En ratones deficientes en los genes que codifican para los receptores de las señales "eat me", como por ejemplo la proteína MFG-E8, se observó un defecto en la fagocitosis de células apoptóticas y autoinmunidad (49). Sin embargo, los ratones deficientes en los receptores tipo "tethering", como la proteína CD14, no presentaron alteraciones en la producción de citoquinas antiinflamatorias ni un aumento de anticuerpos antinucleares, a pesar de observarse una fagocitosis menos eficiente (27). Otros estudios en ratones han demostrado que para mantener la tolerancia inmunológica propia, también es fundamental que se produzca una correcta degradación del material genético de la célula apoptótica en el interior del fagosoma (64). Si el DNA de la célula apoptótica que ha sido engullida no se degrada correctamente se activa la respuesta inmune innata, provocando enfermedades como anemia severa en embriones o artritis crónica en adultos (63, 64).

2. OBJETIVOS:

Los objetivos de este proyecto de Tesis se enumeran a continuación:

1. Clonaje, expresión y purificación del dominio N-terminal rico en cisteínas de las proteínas murinas de la familia TIM (mTIM).
2. Cristalización y determinación de la estructura cristalográfica de las proteínas mTIM-3 y mTIM-4.
3. Identificación de nuevos ligandos de las proteínas TIM: Interacción de las proteínas TIM murinas con fosfolípidos *in vitro*.
4. Cristalización y determinación de la estructura cristalográfica de las proteínas TIM en complejo con el ligando fosfatidilserina (FS).
5. Caracterización de la contribución de diversos residuos del dominio N-terminal de las proteínas TIM en el reconocimiento de FS.
6. Efecto de los polimorfismos descritos para TIM-1 y TIM-3 en la unión a FS.
7. Interacción del dominio N-terminal de las proteínas TIM con membranas que contienen FS, análisis biofísico.
8. Afinidad y cinéticas de unión de las proteínas TIM a FS en membranas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS:

3.1. cDNAs y anticuerpos.

3.1.1. cDNAs.

Los cDNAs para las variantes polimórficas HBA y BALB/c de mTIM-1 fueron cedidos por el laboratorio de R. DeKruyff (91). Los cDNAs codificantes para mTIM-2 y mTIM-4 se obtuvieron de una librería de cDNA de glándula mamaria de ratón C57BL/6J (IMAGE consortium, ATCC). El cDNA para la variante polimórfica BALB/c de mTIM-3 fue obtenido de una librería de cDNA derivada de células-2 de embrión de ratón Knowles-Solte (IMAGE consortium, ATCC). En cambio, el cDNA para la variante polimórfica HBA de mTIM-3 se generó en el laboratorio a partir del cDNA de la variante BALB/c mediante mutagénesis dirigida. Para ello, mutamos los siete residuos polimorfismos del dominio N-terminal de mTIM-3, sustituyendo los residuos de la variante BALB/c por los de HBA mediante el método de PCR solapante usando los oligos HBA1 y HBA2 (Tabla 2).

3.1.2. Anticuerpos.

Los anticuerpos monoclonales contra mTIM-1 RMT1-10 y RMT1-4, el anticuerpo policlonal contra mTIM-4 y los anticuerpos contra mTIM-3 8B.2C12 y RMT3-23 utilizados en este trabajo de Tesis fueron adquiridos en la casa comercial eBioscience, Inc. El anticuerpo contra mTIM-1 3B3 y el anticuerpo monoclonal contra mTIM-4 21H12 fueron cedidos por el laboratorio de R. DeKruyff (103, 151).

3.2. Producción de proteínas TIM murinas en bacteria.

3.2.1. Expresión del dominio N-terminal de las proteínas TIM en bacteria.

Los cDNAs codificantes para el dominio rico en cisteínas de mTIM-1 (residuos 20-130), mTIM-2 (residuos 20-129), mTIM-3 (residuos 23-134) y mTIM-4 (residuos 43-154) fueron clonados en los sitios de restricción NdeI y BamHI del vector pET-27b(+) (Novagen) modificado (Fig. 3.1B) (58). Las proteínas resultantes contenían el dominio N-terminal de las proteínas TIM seguidas por una señal de corte para trombina (LVPRGS), un epítipo del virus herpes (HSV, SQPELAPEDPED) y una cola C-terminal de 6

histidinas (Fig. 3.1A). Los plásmidos resultantes se amplificaron en bacterias *E. coli TOP10F'* y posteriormente se transformaron en bacterias competentes *E. coli BL21 pLys* para la expresión de las proteínas. Se realizó una prueba de expresión previa con 5 clones bacterianos. Para ello se inocularon 20 ml de medio LB (Luria Broth: 10 g de Bacto-Triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g of NaCl, pH 7,4) con cada clon y se crecieron a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (DO) a 600 nm de 0,7. Una vez alcanzada dicha densidad, se indujo la expresión de la proteína con 0,5 mM de isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) durante 2 horas a 37°C. La expresión de proteína se analizó por electroforesis en condiciones reductoras mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico).

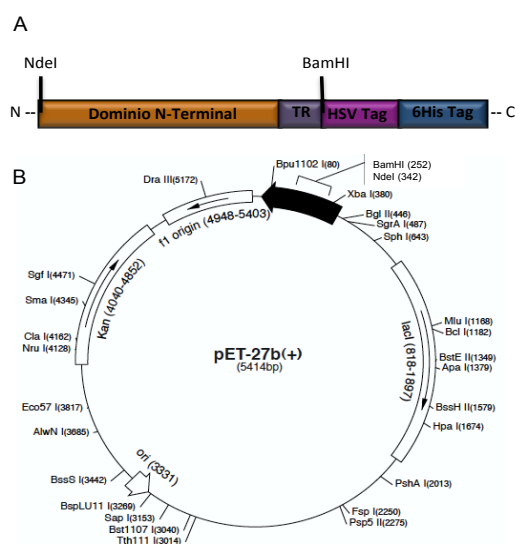


Figura 3.1. Construcción de los dominios N-terminales de las proteínas TIM para su expresión en bacteria. A. Esquema de las construcciones de las proteínas TIM constituidas por el dominio N-terminal de las proteínas, un sitio de reconocimiento de trombina (TR), un epítopo HSV y un epítopo de seis residuos de histidina. Se indican las dianas para los enzimas de restricción BamHI y NdeI usadas en el proceso de clonaje. B. Plásmido pET-27b+ (Novagen) utilizado para el clonaje y la expresión de los dominios N-terminales de las proteínas TIM en bacteria.

Una vez comprobada la expresión de la proteína, se seleccionó el clon donde la inducción de proteína fue más notable, con el que se procedió a la producción de proteína. Se inocularon 500 ml de medio LB y se indujo la expresión de la proteína con IPTG, tal y como se ha descrito para las pruebas de expresión. Habitualmente se crecieron 4 cultivos simultáneamente (dos litros de medio LB en total). Tras la inducción, las bacterias se sedimentaron mediante centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en tampón de resuspensión (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,2 M NaCl, 5 mM EDTA, 5-10 mM DTT). Se utilizaron 10 ml de tampón de resuspensión por cada 500 ml de cultivo celular. Posteriormente se añadió lisozima a una concentración de 1mg/ml y se incubó la suspensión bacteriana en hielo durante 15 minutos. Posteriormente, se añadió tritón X-100 y Deoxicolato sódico a una concentración

final de 0,5 % y se congeló la mezcla a -80°C. Finalmente, se descongeló la suspensión bacteriana en un baño de agua a 37°C y se congeló de nuevo en hielo seco con etanol repetidamente (tres veces en total), para conseguir una lisis completa de la pared bacteriana. Seguidamente la mezcla se sonicó dos veces durante 1 minuto, para homogeneizar, destruir el DNA bacteriano y clarificar la solución. Una vez sonicada, se procedió a la centrifugación de la muestra a 15000 rpm durante 10 minutos a 4° C. Se observó que las proteínas TIM aparecían en el sedimento, lo que indicaba que las proteínas no eran solubles y posiblemente formaban cuerpos de inclusión. Por lo tanto, se procedió a la purificación de los cuerpos de inclusión para la preparación de proteínas solubles mediante replegamiento *in vitro*.

Los cuerpos de inclusión obtenidos en el sedimento se resuspendieron en tampón de lavado 1 (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5 % (v/v) tritón X-100), en una proporción de 10 ml de tampón por cada 500 ml de cultivo, se sonicaron dos veces durante un minuto y se sedimentaron de nuevo a 15000 rpm (rotor SS34, Sorvall). Este proceso de resuspensión, sonicación y centrifugado se repitió tres veces para eliminar las proteínas contaminantes de los cuerpos de inclusión. A continuación se eliminó el detergente proveniente del tampón de lavado 1 mediante la resuspensión de los cuerpos de inclusión en tampón de lavado 2 (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 2,0 M NaCl, 1,0 M urea, 1 mM EDTA, 1 mM DTT). Se realizó un último proceso de limpieza de los cuerpos de inclusión en el tampón de lavado 3 (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT), principalmente para eliminar la elevada concentración de NaCl del tampón de lavado 2. Tras el último lavado, los cuerpos de inclusión se solubilizaron con agitación durante 2 h a temperatura ambiente en 10 ml de un tampón de resuspensión que contenía una alta concentración de urea (25 mM MES pH 6,5, 8,0 M urea, 10 mM EDTA, 1 mM DTT). Se eliminó el material insoluble mediante centrifugación y los cuerpos de inclusión solubilizados se conservaron a -80°C. La pureza de la muestra de proteína se analizó mediante electroforesis. La concentración de proteína en las muestras se estimó mediante la medida de la DO a 280 nm en varias diluciones.

3.2.2. Preparación del dominio N-terminal de las proteínas TIM mediante repliegamiento *in vitro*.

Las proteínas insolubles que formaban cuerpos de inclusión se sometieron a un proceso de repliegamiento *in vitro* por el método de dilución. Para ello, se prepararon 10 ml de cuerpos de inclusión resuspendidos en tampón de resuspensión con un total de 250 unidades de absorbancia a 280 nm en el caso de mTIM-1, 40 unidades para mTIM-2, 700 unidades en el caso de mTIM-3 y 500 unidades en el caso de mTIM-4. Estas muestras se añadieron, aproximadamente 3 ml cada 12 horas, a un litro de tampón de repliegamiento (0,1 M Tris-HCl pH 8,3, 400 mM L-arginina, 2 mM EDTA, 6,3 mM cisteamina, 3,7 mM cistamina y 0,1 mM PMSF) en agitación a 4°C. Tras 36 horas desde la primera adición de muestra se procedió a la concentración de la solución de repliegamiento mediante una celda de ultrafiltración con agitación Amicon 8300 (Millipore), provista de un disco de filtración (Pall Life Sciences) con un tamaño de poro de 3 kDa, hasta obtener aproximadamente unos 20 ml de muestra. Finalmente se concentró la solución de proteína hasta un volumen de 3 ml mediante un concentrador Centriprep Ultracel YM-3 (Amicon) con un tamaño de poro de 3 kDa. Una vez concentrada, la muestra de proteína replegada se sometió a una cromatografía de exclusión molecular para la separación de las muestras de proteína solubles y los agregados proteicos. Se utilizó una columna de Superdex-75 prep grade (GE-Healthcare) con un tampón que contenía 25 mM Tris-HCl pH 8,0 y 100 mM NaCl. Para las tres proteínas murinas se observó que la mayor parte de la muestra eluía con un volumen de exclusión similar al esperado para las proteínas monoméricas, de aproximadamente 18 kDa. La pureza de la proteína en las diferentes fracciones de elución se analizó por electroforesis y se estimó la concentración de proteína mediante la medida de la DO a 280 nm.

En ciertos casos, como para la preparación de muestras para cristalografía, la cola de histidinas y el epítipo HSV presentes en el extremo C-terminal de las proteínas se eliminaron por tratamiento con trombina (Amershan) a una concentración de 30 U/mg proteína durante 16 horas a 25°C. La proteína tratada con trombina se sometió a un segundo paso de purificación por cromatografía de intercambio iónico para eliminar así el segmento de proteína cortado. Tras el tratamiento con trombina, mTIM-1 (pI 7,67), mTIM-2 (pI 6,58) y mTIM-3 (pI 8,24) se dializaron contra un tampón de acetato sódico 25 mM pH 5,0. Posteriormente, mTIM-1 y mTIM-3 se purificaron con una columna de intercambio catiónico HiTrap SP-Sefarosa (GE Healthcare) usando tampón de acetato

sódico pH 5,5 y un gradiente salino de 0 a 0,5 M NaCl. Por el contrario, mTIM-2 se purificó con una columna de intercambio aniónico HiTrap monoQ-Sefarosa (GE Healthcare), con tampón de acetato sódico 25mM pH 5,5 y un gradiente de salino de 0 a 0,5 M NaCl. En el caso de mTIM-4 no fue necesario el paso previo de diálisis de la proteína, ya que mTIM-4 presenta un punto isoeléctrico (pI) mucho mayor (pI 9,36). Por lo tanto, mTIM-4 tratada con trombina se cargó directamente en una columna de intercambio catiónico similar a la usada para mTIM-1 y mTIM-3, con un tampón Hepes 25mM pH 7,5 y con un gradiente salino del 0,2 al 0,5M NaCl.

Los dominios IgV de las proteínas TIM murinas usadas para los ensayos de BIAcore y para los experimentos de espectroscopía de fluorescencia no fueron sometidos al tratamiento con trombina, sino que, tras la cromatografía de exclusión, las proteínas con la cola de histidinas y el epítipo HSV en el extremo C-terminal se purificaron directamente mediante cromatografía de intercambio iónico. Tras la purificación de las proteínas por cromatografía de intercambio iónico, se concentraron las fracciones resultantes y se cambió el tampón de la muestra durante la concentración, para obtener todas las proteínas en el mismo tampón (Hepes 25 mM pH 7,5 y 100 mM de NaCl).

3.3. Producción de proteínas TIM en células de mamífero.

3.3.1. Producción de proteínas TIM-Fc solubles en células de mamífero.

Para la expresión de proteínas TIM solubles en células eucariotas se amplificaron por PCR (Polymerase Chain Reaction) los cDNAs correspondientes a toda la zona extracelular de mTIM-1 (residuos 1-205), mTIM-2 (residuos 1-222), mTIM-3 (residuos 1-191) y mTIM-4 (residuos 1-298). Para la expresión de los dominios IgV de las proteínas se clonaron los cDNAs correspondientes a dicho dominio de mTIM-1 (residuos 1-130) y mTIM-4 (residuos 1-154) y para la expresión del dominio mucina se clonaron los cDNAs correspondientes a dicho dominio de mTIM-1 (residuos 130-205) y mTIM-4 (residuos 153-298). Estos cDNAs se clonaron con el péptido señal endógeno en los sitios de restricción únicos Sall y BamHI del vector pEF-Fc (Tabla 3.1). El vector pEF-Fc proviene de la modificación del vector pEF-BOS (58), y contiene el DNA genómico de la porción Fc de la proteína IgG1 humana (Fc). Los cDNA, que contienen el péptido señal endógeno, se clonaron seguidos de una señal para la trombina (LVPRGS) y una secuencia de “splicing” (GCTGAGT), de manera que se genere una proteína de fusión (TIM-Fc) y

ésta se secrete al sobrenadante celular. Por lo tanto, las proteínas TIM-Fc son proteínas bivalentes que contienen toda la región extracelular de la proteína TIM.

La producción de proteínas se llevó a cabo transfectando de manera transitoria células HEK-293T mediante el método del fosfato cálcico (52, 114). Un día antes de la transfección se sembraron 2×10^6 células en placas de 100 mm con medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FCS) y 4 mM de glutamina. Las células se transfectaron con 5 μ g de cDNA durante 15 horas, tras las que se lavaron con PBS suplementado con cationes y medio DMEM. Tres días después, se recogieron los sobrenadantes celulares, se centrifugaron para eliminar restos celulares y se procedió a la cuantificación de las proteínas mediante ELISA tipo sándwich (58). Para la realización de este ELISA se utilizaron dos anticuerpos que reconocen la región Fc de IgG1 humana. Un anticuerpo específico para el dominio CH2 de IgG humana (DAKO), con el que se tapizaron los pocillos de una placa de 96 pocillos (F96 maxisorp plates, Nunc), y un segundo anticuerpo secundario contra la porción Fc de la proteína IgG humana (DAKO) acoplado a peroxidasa (HRP, horseradish peroxidase) (human IgG-HRP, DAKO). Así mismo, se utilizó una proteína fusionada a Fc de concentración conocida, con la que se generó una curva patrón para la determinación de la concentración de las proteínas en sobrenadantes a partir de la DO obtenida en los ELISA.

Tabla 3.1. Proteínas mTIM fusionadas a Fc expresadas en células de mamífero y secuencia de los oligos N -terminales y C-terminales utilizados para su amplificación y posterior clonaje en el vector pEF-Fc.

	Secuencia de los oligos N y C-terminales (5'-3')
mTIM-1 HBA y BALB/c	TIM1-N:TTGTCGACATGAATCAGATTCAAGGTT TIM1-C:TTAGGATCCACGCGGAACCAGCTTAGTAGGGTTTTTTG
mTIM-2	TIM1-N:TTGTCGACATGAATCAGATTCAAGGTT TIM2-C:TTAGGATCCACGCGGAACCAGCTTATTCAGGTTTTTCTG
mTIM-3 HBA y BALB/c	TIM3-N:TTGTCGACATGTTTTAGGTTCTTACC TIM3-C:TTAGGATCCACGCGGAACCAGTCTGATCGTTTCTCCAGA
mTIM-4	TIM4-N:TTGTCGACATGAATTTGATGATTCAA TIM4-C:TTAGGATCCACGCGCAACCAGGGTCTGTCTGCTGTTGAT
mTIM-1 IgV	TIM1-N:TTGTCGACATGAATCAGATTCAAGGTT TIM1-C5:TTAGGATCCACGCGCAACCAGCTCTGGTTTAACTTGCAA
mTIM-1 muc	TIM1-N4muc:TTAGGATCCTCTAGAATTTCCACACGTCCTCCA TIM1-C:TTAGGATCCACGCGGAACCAGCTTAGTAGGGTTTTTTG
mTIM-4 IgV	TIM4-N:TTGTCGACATGAATTTGATGATTCAA TIM4-CT3:TTAGGATCCACGCGGAACCAGGGCTCTCCTCAGCTCCAA
mTIM-4 muc	TIM4-N3muc:TTAGGATCCTCTAGAACAACAACCAAAAAACCA TIM4-C:TTAGGATCCACGCGCAACCAGGGTCTGTCTGCTGTTGAT

3.3.2. Producción de proteínas TIM-Fc mutantes en células de mamífero.

Los mutantes para las proteínas TIM se obtuvieron mediante la técnica de PCR solapante usando como molde el cDNA para las proteínas TIM nativas y parejas de oligos directo y reverso específicos, que portaban la mutación (Fig. 3.2). El cDNA amplificado portador de la mutación se digirió con las enzimas de restricción Sal I y BamHI durante una hora a 37°C y se clonó en el vector pEF-Fc digerido con las mismas enzimas, de manera que las proteínas se expresarán con sus extremos C-terminales fusionados al fragmento Fc de la proteína IgG1 humana. Con el DNA resultante se transformaron bacterias competentes *E. coli TOP10F'* que fueron usadas para la producción del DNA recombinante en grandes cantidades. La presencia de mutaciones fue comprobada mediante secuenciación. Los vectores de expresión de las proteínas TIM-Fc mutantes se usaron para transfectar células de mamífero HEK-293T por el método de fosfato cálcico (52, 114). La expresión de las proteínas en el sobrenadante celular se comprobó mediante ensayos ELISA con anticuerpos específicos contra las diferentes proteínas. La cuantificación de las proteínas en los sobrenadantes celulares se realizó mediante ELISA tipo sándwich tal y como se describió anteriormente para la cuantificación de las proteínas nativas.

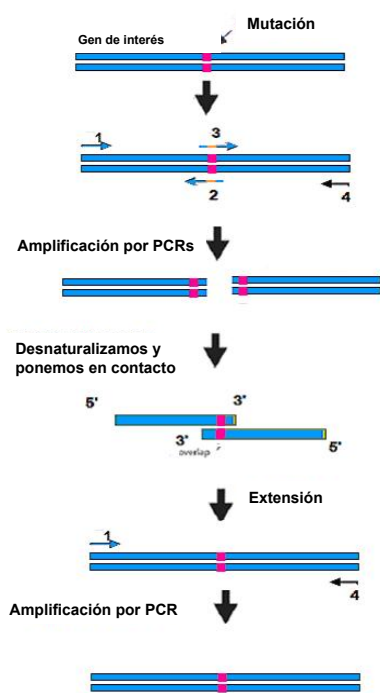


Figura 3.2. Método de mutagénesis dirigida mediante PCR solapantes y oligos portadores de la mutación. Para realizar una mutación puntual por el método de PCR necesitamos diseñar dos oligos solapantes portadores de la mutación, uno directo, correspondiente a la hebra codificante, y otro reverso, de la hebra no-codificante. Con estos oligos realizamos dos PCR independientes sobre el DNA molde que se desea mutar. Una de las PCR la realizaremos con un oligo situado en el extremo 5' del DNA molde (oligo 1) y el oligo reverso portador de la mutación (oligo 2) y, la otra PCR la realizaremos con un oligo del extremo 3' del DNA (oligo 4) y el oligo directo portador de la mutación (oligo 3). En una primera reacción de PCR obtenemos dos fragmentos de PCR con las mutaciones, que se usan como molde de una segunda reacción de PCR, con los oligos correspondientes a los oligos 1 y 4. En esta segunda reacción se genera un único fragmento de cDNA que codifica para una proteína mutante.

Los mutantes para los dominios IgV de las proteínas TIM murinas, así como los oligos directos (hebra codificante) empleados para su preparación se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Mutantes generados para las proteínas TIM y secuencia de los oligos directos usados para su preparación mediante el método de PCR solapante.

	Oligo (5'-3') DIRECTOS
Mutantes generados para mTIM-1	
mTIM-1 R22A	TCAACATATGCTGGAATCACA
mTIM-1 S36A	GGGCAATGCCCAGCTTCTGCTTGTCAA
mTIM-1 S37A	TGCCCATCTGCTGCTTGTCAA
mTIM-1 W94A	ATTCCTGGAGCGTTTAATGAT
mTIM-1 F95A	CCTGGATGGGCTAATGATCAG
mTIM-1 W94A/F95A	GAGATTCCTGGAGCGGCCAATGATCAGAAA
mTIM-1 N96A	GGATGGTTTGCTGATCAGAAAGTG
mTIM-1 N96A/D97A	GGATGGTTTGCTGCTCAGAAAGTG
Mutantes generados para mTIM-3	
mTIM-3 hCC	TTCTGTCCTGTGTTTGAATGTACCAAT
mTIM-3 W38A	TTCTGTCCTGCGTCACAGTGT
mTIM-3 L95A/M96A	CAGTTCCTGGTGCCGCGAATGATAAAAAA
mTIM-3 N97A/D98A	CCTGGTCTTATGGCCGCTAAAAAATTAGAA
mTIM-3 HBA1	TCATTGGAAAATGCTTATGTGTTTGAGGTTGGT
mTIM-3 HBA2	TACACTCTATCTACACCTGGGGCACTTGTGCCT
Mutantes generados para mTIM-4	
mTIM-4 R25A	TGGTCCCAGAGCGCCAACAGTATGTGC
mTIM-4 R25E	TGGTCCCAGAGCGAGAACAGTATGTGC
mTIM-4 N37A	GGTTCATGTCCCGCGTCCAAGTGCAAT
mTIM-4 N37D	GGTTCATGTCCCGATTCCAAGTGCAAT
mTIM-4 S38A	TGTCCCAATGCCAAGTGCAAT
mTIM-4 F96A	CCTGGCTGGGCCAATGAT
mTIM-4 W95A	CCTGGCGCGTTCAATGAT
mTIM-4 W95A/F96A	CCTGGCGCGGCCAATGAT
mTIM-4 N97A	GGCTGGTTCGCTGATGTCAAG
mTIM-4 N97A/D98A	GGCTGGTTCGCTGCTGTCAAGAAG

3.4. Cristalización y determinación de la estructura del dominio N-terminal de las proteínas TIM murinas.

3.4.1. Cristalización y determinación de la estructura del dominio N-terminal de mTIM-4.

Tras la purificación del dominio N-terminal de mTIM-4, éste se concentró hasta aproximadamente 20 mg/ml con un concentrador Microsep (PALL, Life Sciences) de un tamaño de poro de 3 kDa. Durante la concentración se ajustó la concentración de NaCl hasta aproximadamente 100 mM.

La cristalización del dominio N-terminal de mTIM-4 se consiguió por el método de gota colgante en la misma condición de cristalización que se usó para mTIM-1 (30% PEG-2000 metil-éter, 5% PEG-400, 0,1M sulfato amónico y 0,1 M acetato sódico pH 5,6) (129), pero con la adición del detergente O-n-octilfosforil colina a una concentración de 100 mM (Tabla 3.3). Usamos placas de 24 pocillos (Costar® Corning Incorporated) donde se añadieron 500 µl de solución de cristalización en el reservorio. Se realizaron gotas de 2,1 µl (1 µl de proteína, 0,1 µl de detergente y 1 µl de solución de cristalización) manualmente sobre un portaobjetos siliconizado, el cual se colocó sobre los pocillos de la placa y se selló con vaselina. Los cristales, que presentaban una forma hexagonal, fueron incubados en una solución de la misma composición que la solución de cristalización a la que se le añadió un 5% de glicerol como crioprotectante. A continuación, los cristales se montaron en criolazos y se congelaron en nitrógeno líquido para proceder a su traslado a las líneas de radiación sincrotrón del ESRF (European Synchrotron Radiation Facility), donde se colectaron los datos de difracción. Estos cristales difractaron a una resolución de aproximadamente 3,0 Å, pertenecían al grupo espacial P321, contenía una sola molécula de mTIM-4 en la unidad asimétrica y un 54 % de solvente (Tabla 3.3). A esta primera forma cristalina obtenida para el dominio N-terminal de mTIM-4 la denominamos X1.

Posteriormente, se realizaron pruebas de cristalización de la proteína usando kits comerciales (Crystal ScreenTM, Hampton Research) con objeto de obtener cristales que difractaran a una mejor resolución. De esta manera, se obtuvo una nueva forma cristalográfica para mTIM-4 a la que denominaremos X2. Estas pruebas de cristalización se realizaron por el método de gota sentada en placas CrystalQuickTM de 96 pocillos (Greiner), con 200 µl de solución de cristalización en el reservorio y gotas de 0,3 µl (0,15 µl de proteína a 10 mg/ml y 0,15 µl de solución de cristalización). Las gotas fueron

dispensadas automáticamente usando un robot nanodispensador Tecan Genesis RSP 150 suplementado con el correspondiente software Gemini versión 4.2. Los nuevos cristales obtenidos para mTIM-4 se obtuvieron en una solución de cristalización compuesta por 0,8 M de tartrato de sodio y potasio y 0,1 M Hepes pH 7,5. Para la congelación de estos cristales previa al transporte a las líneas de radiación sincrotrón del ESRF, se usó solución de cristalización con 30% de etilenglicol como crioprotectante. Estos nuevos cristales con forma de prismas hexagonales, difractaron a una resolución de 2,2 Å, contenían una molécula en la unidad asimétrica y un 62,5 % de solvente. Los cristales pertenecían al grupo espacial P6₃22, distinto al de los cristales de la forma cristalográfica X1 (Tabla 3.3).

Tabla 3.3 Condiciones de cristalización y características de los cristales de los dominios N-terminales de las proteínas mTIM-4 y mTIM-3.

	mTIM-4 X1	mTIM-4 X2	mTIM-3
[Proteína]	15 mg/ml	10 mg/ml	12 mg/ml
Método	Gota colgante	Gota sentada	Gota colgante
Condición De Cristalización	30% PEG-2000 metil-éter 5% PEG-400 0,1 M sulfato amónico 0,1 M Acetato sódico pH 5,6 + O- octilfosforil Colina	0,5-0,8 M Na K tartrato 0,1 M Hepes pH 7,5	30% PEG-2000 metil-éter 5%PEG-400 0,1 M Tris-HCl pH 8 0,2 M sulfato amónico
Forma	Placas hexagonales	Prismas hexagonales	Barras en clúster
Grupo espacial	P321	P6 ₃ 22	P2 ₁
Mol / U.A.	1	1	1

Con los cristales de las formas cristalográficas X1 y X2 de TIM-4 se colectaron conjuntos de datos completos. Las imágenes de difracción tomadas se procesaron con el programa XDS (29) y se escalaron utilizando el programa Scala (18). Las estructuras de mTIM-4 para las dos formas cristalinas se resolvieron mediante el método de reemplazo molecular utilizando el programa PHASER (89) y la estructura de mTIM-2 (PDB ID 2OR7) previamente resuelta en el laboratorio, como modelo. El modelo carecía de los lazos BC, CC' y FG del dominio IgV de mTIM-2. La forma cristalina X1 fue refinada utilizando CNS (9), mientras que la forma cristalina X2 fue refinada con Refmac (101). Las estructuras fueron ajustadas manualmente y posteriormente refinadas con los

programas mencionados hasta que todos los residuos se ajustaron a los mapas de densidad electrónica y presentaban una geometría correcta, dentro de las regiones permitidas del diagrama de Ramachandran.

3.4.2. Cristalización y determinación de la estructura del dominio N-terminal de mTIM-3.

Tras el replegamiento y purificación del dominio N-terminal de mTIM-3, la proteína se concentró hasta aproximadamente 20 mg/ml y se ajustó la concentración de NaCl hasta 100 mM durante su concentración, tal y como se describió para mTIM-4.

Para la cristalización de mTIM-3 se ensayaron condiciones de cristalización similares a las usadas previamente para la cristalización de mTIM-1 y mTIM-4 X1. La cristalización de mTIM-3 se consiguió mediante el método de gota colgante usando una muestra de proteína a una concentración de 12 mg/ml y una condición de cristalización compuesta por 30% PEG-2000 metil-éter, 5% PEG-400, 0,2 M de sulfato amónico y 0,1 M Tris-HCl pH 8,0. Se realizaron gotas de 2 μ l (1 μ l de proteína y 1 μ l de solución de cristalización) y se añadieron 500 μ l de solución de cristalización en el reservorio. Los cristales obtenidos presentaron forma de barras que crecían pegadas formando agrupaciones. Para la congelación de estos cristales se usó solución de cristalización con un 5% de glicerol como crioprotectante. Estos cristales, difractaron a una resolución máxima de 2,6 Å, usando radiación de sincrotrón (ESRF). Pertenecían al grupo espacial P2₁ y presentaban una molécula en la unidad asimétrica (Tabla 3.3).

La determinación de la estructura cristalográfica de mTIM-3 se llevó a cabo mediante el método del reemplazo molecular usando el programa PHASER (89) y la estructura de mTIM-3 previamente determinada como modelo (PDB ID 2OYP) (10). Durante el proceso de refinamiento los modelos estructurales fueron procesados mediante sucesivos ciclos de ajuste manual a los mapas de densidad electrónica y fueron refinados con el programa Phenix.refine 1.4. (147).

3.5. Cristalización y determinación de la estructura del dominio N-terminal de las proteínas TIM murinas en complejo con Fosfatidilserina (FS).

3.5.1. Cristalización y determinación de la estructura del dominio N-terminal de mTIM-4 en complejo con FS.

Para la cristalización de mTIM-4 en complejo con FS, realizamos una incubación previa a 4°C de la proteína, a una concentración final de 15 mg/ml, con el compuesto Dicaproyl fosfatidil serina (DCFS, Avanti polar lipids) a una concentración final de 5mM. La incubación se realizó durante toda la noche en tampón Hepes 25 mM pH 7,0 con 100 mM NaCl y en presencia de 5 mM de CaCl₂. Tras la incubación, procedimos a la cristalización del complejo mediante el método de gota sentada. Para ello, se realizaron gotas de 0,3 µl (0,15 µl de incubación y 0,15 µl de solución de cristalización) que fueron dispensadas automáticamente por un robot nanodispensador Tecan Genesis RSP 150 suplementado con el correspondiente software Gemini versión 4.2, en placas CrystalQuick™ de 96 pocillos (Greiner), con diferentes condiciones de cristalización contenidas en kit comerciales (JBScreen Basic HTS, Jena Bioscience).

Obtuvimos cristales de forma hexagonal, con una solución de cristalización que contenía 10% Jefamina M600, 10 mM Cl₃Fe y 0,1 M de citrato sódico pH 5,6. A esta nueva forma cristalina obtenida para mTIM-4 la llamamos forma cristalográfica X3. Para su congelación, los cristales fueron incubados durante un corto periodo de tiempo en solución de cristalización con 20% de glicerol como crioprotectante. Los cristales congelados en criolazos, se transportaron a las líneas de sincrotrón del ESRF para la colección de datos cristalográficos. Estos cristales pertenecieron al grupo espacial P6₃22, contenían una molécula en la unidad asimétrica y aproximadamente un 64% de solvente (Tabla 3.4).

La determinación de la estructura del dominios N-terminal de mTIM-4 en complejo con FS se llevó a cabo mediante el método de reemplazo molecular usando la estructura de mTIM-4 sin ligandos como modelo. Los modelos estructurales obtenidos fueron sometidos a varios ciclos de ajuste manual a los mapas de densidad electrónica y fueron refinados con el programa Refmac (101). Todos los residuos del complejo se encuentran en regiones permitidas del mapa de Ramachandran.

3.5.2. Cristalización y determinación de la estructura del dominio N-terminal de mTIM-3 con FS.

Para la cristalización de mTIM-3 con el compuesto DCFS, realizamos una incubación previa durante toda la noche a 4°C de una muestra de proteína a una concentración de 15 mg/ml con 5 mM de DCFS, en presencia de 5 mM Cl_2Ca , tal y como se describió para mTIM-4. Con esta mezcla se obtuvieron cristales por el método de gota sentada usando una condición de cristalización que contenía 22% de PEG-4000, 0,1 M de citrato sódico pH 5,6, 50 mM NaF y 5 mM de Cl_2Ca a una temperatura de 21°C. No obstante, estos cristales aparecían pegados a la placa y se dañaban al ser desprendidos de la misma. Por lo tanto, se desarrolló la técnica de gota flotante en placas de 24 pocillos Cryschem usadas habitualmente para gota sentada. Inicialmente se dispensaron 15 μl de parafina (MERK) en cada pocillo, sobre la que se añadió una mezcla de solución de proteína-DCFS (1 μl) y solución de cristalización (2 μl). El reservorio contenía 500 μl de solución de cristalización. La presencia de parafina evitó el pegado de los cristales a la placa, de forma que se pudieron manipular sin ser dañados.

Tabla 3.4. Condiciones de cristalización y características de los cristales de los dominios N-terminales de las proteínas mTIM-4 y mTIM-3 en complejo con FS

	mTIM-4 con FS (mTIM-4 X3)	mTIM-3 con FS
[Proteína]	15 mg/ml	15 mg/ml
Método	Gota sentada	Gota sentada
Condición De Cristalización	10% Jefamina M600 10 mM Cl_3Fe 0,1 M citrato sódico pH 5,6	22% de PEG-4000, 0,1 M de citrato sódico pH 5,6, 50 mM NaF y 5 mM de Cl_2Ca
Forma	Placas hexagonales	Placas hexagonales
Grupo espacial	P6 ₃ 22	R32
Mol / U.A.	1	2

Los cristales fueron congelados usando una solución que contenía 25% de PEG-4000, 0,1 M de acetato sódico pH 5,6, 50 mM NaF, 5 mM de Cl_2Ca , y 10 % de glicerol

como crioprotector. Se transportaron congelados en nitrógeno líquido a la línea ID23-2 del ESRF. Los cristales difractaron a 3,0 Å de resolución en la línea de sincrotrón ID23-2 del ESRF, pertenecen al grupo espacial R32, presentan dos moléculas en la unidad asimétrica y contienen un 50% de solvente (Tabla 3.4).

La estructura cristalográfica fue resuelta por reemplazo molecular usando el programa PHASER (89) y la estructura de mTIM-3 sin ligandos previamente resuelta como modelo (PDB ID 2OYP). La estructura fue refinada usando el programa Phenix.refine 1.4. (147). Los modelos se ajustaron manualmente a los mapas de densidad electrónica durante el proceso de refinamiento. Todos los residuos presentan una correcta geometría y se encuentran en regiones permitidas del mapa de Ramachandran.

3.6. Preparación de Liposomas.

Inicialmente se prepararon soluciones madre de fosfolípidos a una concentración de 10 mg/ml en una mezcla de cloroformo:metanol en una relación 3:1. Se prepararon soluciones madres para los fosfolípidos: FS (P5660, Sigma-Aldrich), FC (P3556, Sigma-Aldrich) y Biotinil fosfatidiletanolamina o Biot-PE (870282P, Avanti Polar lipids). Estas mezclas se han usado para la preparación de los liposomas necesarios para el desarrollo de este trabajo de Tesis.

La preparación de los liposomas se realizó en tubos de vidrio, con mezclas de soluciones madre de diferentes fosfolípidos, acordes con la composición deseada de liposomas. Las muestras se homogeneizaron por agitación con un vortex y posteriormente se procedió a la evaporación del solvente. Para ello, sometemos a la muestra a una corriente de nitrógeno gas durante aproximadamente 30 minutos. Finalmente, se procedió a la eliminación completa de componentes orgánicos de la muestra mediante el secado en un speedvac durante dos horas. Una vez eliminado el solvente, se hidrató la mezcla con un tampón que contenía 5 mM Tris-HCl pH 7,0 y 150 mM de NaCl, al que denominaremos tampón de monocapa. La muestra se resuspendió completamente mediante su incubación a 37°C durante una hora, con agitación cada 10 minutos. La mezcla resultante se homogeneizó con ayuda de un Extrusor (Mini-Extruder, Avanti Polar Lipids) y membranas de policarbonato de 100 nm de poro (PC membranes, Avanti Polar Lipids), proceso que genera vesículas unilamelares grandes (Large unilamellar vesicles, LUV) (Fig. 3.3).

Los liposomas generados para la consecución de los diferentes experimentos realizados durante el trabajo de Tesis han sido los siguientes:

- Liposomas de 100% de FS.
- Liposomas de 100% de FC.
- Liposomas de 90% de FS y 10% de FC.
- Liposomas de 75% de FS y 25% de FC.
- Liposomas de 50% de FS y 50% de FC.
- Liposomas de 25% de FS y 75% de FC.
- Liposomas de 10% de FS y 90% de FC.
- Liposomas de 5% de FS y 95% de FC.
- Liposomas de 2,5% de FS y 97,5% de FC.
- Liposomas de 1% de FS y 99% de FC.

Para los ensayos de unión a liposomas en placa, los liposomas generados contenían un 1% de Biot-PE, un lípido biotinilado, de manera que pudimos controlar la unión efectiva de los liposomas a las placas mediante su detección con estreptavidina conjugada con HRP (Streptavidin-HRP, Invitrogen). Por el contrario, los liposomas utilizados en los experimentos de unión de las proteínas TIM a liposomas mediante la técnica de resonancia de plasmones de superficie (surface plasmon resonance, SPR) en un BIAcore3000 y espectroscopía de fluorescencia, no fueron suplementados con el fosfolípido biotinilado.

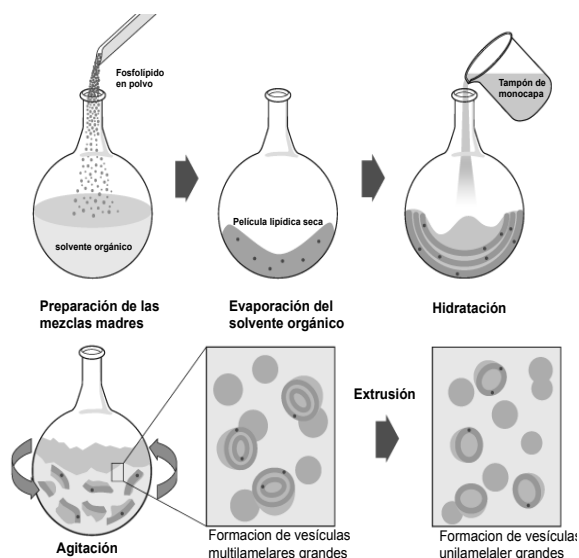


Figura 3.3. Preparación de liposomas. Los liposomas se prepararon a partir de soluciones madre de diferentes fosfolípidos. Inicialmente los fosfolípidos se disuelven en una mezcla de cloroformo:metanol (3:1). En un segundo paso, se mezclan las soluciones de fosfolípidos en la relación deseada y se evapora el solvente. A continuación se hidrata la mezcla sólida con una solución acuosa y agitación discontinua. Al hidratar la película lipídica se forman vesículas multilamelares grandes de tamaños diversos. Por último, los liposomas se someten a un proceso de extrusión, que genera vesículas unilamelares grandes de un tamaño homogéneo.

3.7. Ensayos de unión de las proteínas TIM-Fc a FS.

3.7.1. Ensayos de unión de las proteínas TIM-Fc a FS en liposomas.

Los ensayos de unión de las proteínas TIM murinas solubles a liposomas se realizaron con proteínas TIM fusionadas a Fc (TIM-Fc) y con liposomas inmovilizados en placas de ELISA de 96 pocillos. Los liposomas se inmovilizaron en las placas durante 1 hora a 37°C, tras la adición de 50 µl de liposomas a una concentración final de 0,01 mM en tampón de monocapa. Seguidamente, los pocillos con liposomas se bloquearon durante una hora a 37°C con albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich) al 2% en tampón de unión (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl y 2,5 mM de CaCl₂). Tras cuatro lavados con 200 µl de tampón de unión, se añadieron sobrenadantes celulares con concentraciones de proteína conocida (20, 10, 5, 2,5, 1, 0,5, 0,25 y 0,1 µg/ml) en medio celular DMEM suplementado con un 5% de FCS, y se incubaron durante una hora a 37°C. Tras el lavado de la placa para eliminar las proteínas no unida, se detectaron las proteínas TIM-Fc unidas a los liposomas con un anticuerpo anti-Fc conjugado con peroxidasa (human IgG-HRP, Dako). El revelado del ensayo de unión se realizó con el uso del substrato OPD (*o*-Phenylenediamine dihydrochloride, ZYMED) para peroxidasa, que genera una señal colorimétrica cuantificable por la DO a 492 nm en un espectrofotómetro. En experimentos de unión en placa, se monitorizó la unión inespecífica como la unión de las proteínas TIM-Fc a liposomas de FC. La señal de unión a estos liposomas fue sustraída de la unión específica de dichas proteínas a liposomas de FS. Los ensayos de unión se realizaron por duplicado un mínimo de tres veces, usando sobrenadantes de proteínas TIM murinas procedentes de al menos dos transfecciones celulares independientes para garantizar la fiabilidad del ensayo.

Los ensayos de unión de las proteínas TIM-Fc a liposomas se realizaron con diferentes concentraciones de proteína, diferente tiempo de unión o diferente composición de liposomas inmovilizados en la placa, tal y como se indica en los diferentes experimentos presentados en *Resultados*.

3.7.2. Ensayos de competición de la unión de las proteínas TIM-Fc a FS en liposomas.

En los experimentos de competición de la unión de las proteínas TIM-Fc a liposomas, se inmovilizaron liposomas de FS o FC en placas de 96 pocillos tal y como se

hizo para los ensayos de unión descritos previamente. En estos experimentos, las proteínas mTIM-1-Fc y mTIM-4-Fc a una concentración de 20 µg/ml se incubaron durante una hora a 4°C con los diferentes inhibidores a concentraciones finales de 5, 10, 20, 50 y, 100 mM, antes de ser añadidos a los pocillos con liposomas inmovilizados. La interacción se compitió con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, Sigma-Aldrich), compuesto quelante de cationes divalentes como el calcio, fundamental para la interacción de las proteínas TIM con FS; tartrato, compuesto unido al MILIBS de mTIM-4 en la forma cristalográfica X2 y que por lo tanto podría competir con la unión de dicha proteína a FS; DCFS, compuesto derivado de la FS usado para la cocrystalización con las proteínas TIM ; cloruro sódico, para observar la importancia de la carga iónica en la interacción. Se comparó la unión de las proteínas, determinada como DO a 492 nm, en presencia y ausencia de competidores. La unión a liposomas de FC se utilizó como control negativo, y se sustrajo de los valores obtenidos con liposomas de FS. Ya que se alcanzó saturación en la inhibición, se determinó la concentración al 50% de inhibición (IC₅₀) para cada compuesto.

3.7.3. Ensayos de unión de las proteínas TIM-Fc a fosfolípidos evaporados en placa.

Los ensayos de unión de las dos variantes polimórficas HBA y BALB/c de mTIM-1 y mTIM-3 se realizaron también con fosfolípidos evaporados sobre una placa de ELISA de 96 pocillos. Se añadieron 100 µl de FS y FC a una concentración de 5 µg/ml disueltos en una mezcla de cloroformo:metanol en relación 3:1. La evaporación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante toda la noche en una campana de gases. A la mañana siguiente se bloqueó la placa con BSA al 2% disuelta en tampón de unión durante una hora a 37°C y se procedió tal y como se describe para la unión de las proteínas a FS en liposomas. La señal obtenida por la unión de las proteínas TIM-Fc a FC se consideró como control negativo, y se sustrajo de la señal obtenida con FS.

3.8. Ensayos de unión de las variantes polimórficas de TIM-1 a células apoptóticas.

Los cDNAs para las dos variantes polimórficas larga y corta de mTIM-1 (HBA y BALB/c) y hTIM-1(hTIM1-25 y hTIM1-18), fueron clonados en el vector pEF6/V5-His-TOPO[®] (Invitrogen). La correcta orientación del fragmento clonado, así como la fiabilidad de la secuencia fue comprobada mediante secuenciación. Con estos cDNAs se transformaron bacterias competentes *E. Coli NEB-5α* (New England-BioLabs) para la obtención de cDNA en grandes cantidades. Posteriormente se utilizaron estos cDNAs para obtener células HEK-293H transfectadas estables. Se usó el agente de transfección FuGENE[®]6 (Promega) y Blastidina a una concentración final de 5 µg/ml para la selección de células transfectadas. También se transfectaron células HEK-293H con el vector original pEF6/V5-His-TOPO[®], como control negativo del experimento (HEK-293H Vector). La expresión de las proteínas TIM-1 humana y murina en las células HEK-293H transfectadas con los cDNAs correspondientes fue comprobada por FACS usando anticuerpos específicos contra TIM-1 (3B3 para la proteína murina y 1750 para la humana), marcados con sondas fluorescentes. Las células transfectadas se cultivaron en medio DMEM completo suplementado con 10% de FCS y 5 µg/ml de Blastidina, y usaron para los experimentos de unión a células apoptóticas.

Las células apoptóticas se produjeron a partir de células Jurkat mantenidas en cultivo celular con medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de FCS a una densidad de $1-3 \times 10^5$ células/ml. Se generaron células Jurkat apoptóticas mediante adición de etopósido (Sigma-Aldrich) disuelto en Dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) al cultivo celular a una concentración final de 50 µM, tras incubación de la células en estas condiciones durante toda la noche a 37°C. Seguidamente, se eliminó el etopósido del cultivo celular mediante dos lavados de la suspensión celular con medio RPMI-1640 sin FCS. Finalmente, las células se resuspendieron en medio RPMI sin FCS, y se marcaron con el compuesto CMFDA (CellTracker[™] Green CMFDA de Molecular Probes) a una concentración final de 5 µM, durante 15 minutos a 37°C. Pasado este periodo de tiempo, las células se lavaron dos veces con RPMI-1640 sin FCS para eliminar el CMFDA.

Para la realización del experimento de unión de células apoptóticas a las proteínas TIM-1 expresadas en la superficie de células HEK-293H, el día previo al experimento se sembraron éstas células por triplicado a diferente grado de confluencia (10^5 , 5×10^5 , 10^6 y

2,5x10⁶ células/ml) en placas de cultivo de 12 pocillos. Estas placas habían sido tratadas previamente con colágeno de cola de rata (Sigma-Aldrich), con 250 µl de una solución de 50 µg/ml en PBS por pocillo, para favorecer la adhesión de las células al plástico. Las células apoptóticas marcadas con CMFDA, se añadieron a los pocillos con células HEK-293H transfectadas con las diferentes proteínas TIM o con el vector. Se añadieron 10⁶, 5x10⁵ y 10⁵ células Jurkat respectivamente sobre cada uno de los tres pocillos preparados para cada muestra celular y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, agitando las placas suavemente cada 10 minutos. Pasado este tiempo, se lavaron las células con medio DMEM para eliminar las células Jurkat no unidas y se determinó unión de células Jurkat apoptóticas fluorescentes a las células HEK-293H transfectadas mediante lectura de la señal de fluorescencia en los diferentes pocillos. La fluorescencia se determinó en un lector Biotek synergy HT reader a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 528 nm.

3.9. Ensayos de adsorción de las proteínas TIM murinas a monocapas lipídicas.

3.9.1. Ensayos de adsorción de las proteínas TIM murinas a una interfase liquido-aire.

Los ensayos de adsorción de los dominios N-terminales de las proteínas TIM murinas a una interfase liquido-aire se llevaron a cabo en una microbalanza específicamente diseñada para ello (KSV NIMA) (116). Esta microbalanza tiene capacidad de monitorizar la variación de presión superficial (π) en una subfase líquida de 1,5 ml a una temperatura de 25°C. La variación de la presión superficial durante la adsorción de las proteínas fue monitorizada mediante el método de Wilhelmy utilizando un plató de Wilhelmy de papel de filtro Whatman número 1 (Fig. 3.4).

Para los experimentos de adsorción interfacial de las proteínas TIM se utilizó una subfase de 1,5 ml de tampón de unión (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl y 2,5 mM CaCl₂), donde se inyectaron los dominios N-terminales de las proteínas mTIM-2, mTIM-4 y los mutantes mTIM-4 ND/AA y mTIM-4 FW/AA a diferentes concentraciones, producidos en bacteria y replegados *in vitro*. Se monitorizó la variación de la tensión superficial con el tiempo a concentraciones crecientes de proteína, desde 0,02 a 1µM, hasta que se observó saturación, es decir, en condiciones en las que la tensión no variaba con la concentración

de proteína. La concentración de proteína considerada como saturante fue $0,2 \mu\text{M}$ y se tomo como referencia para realizar los experimentos de inserción a monocapas lipídicas que se explican a continuación.

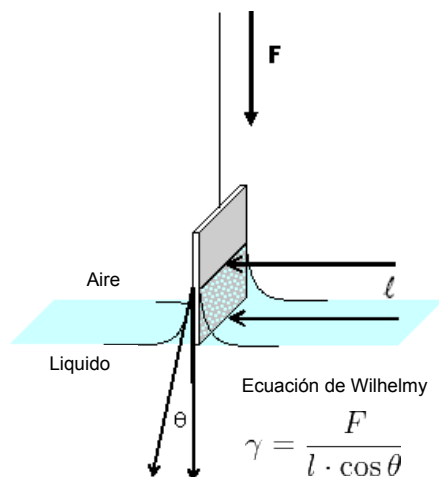


Figura 3.4: Ilustración del método de Wilhelmy para el cálculo de la tensión superficial (γ). El plató de Wilhelmy consiste en un pequeño trozo de papel de filtro o cristal de unos pocos centímetros de perímetro. Este plató se cuelga de un tensiómetro mediante una pequeña argolla de metal y mide la Fuerza (F) que un líquido ejerce sobre el plató por contacto. La tensión superficial (γ) se calcula usando la ecuación de Wilhelmy, donde l es el perímetro del plató y θ es el ángulo de contacto entre la fase líquida y el plató ($\theta=0$).

3.9.2. Ensayos de inserción de las proteínas TIM murinas a monocapas de FS.

Los ensayos de inserción de los dominios N-terminales de las proteínas TIM murinas en monocapas de FS se llevaron a cabo en la misma microbalanza descrita para los experimentos de adsorción interfacial. Se usó una subfase de 1,5 ml de tampón de unión y los dominios N-terminales producidos en bacteria de las proteínas mTIM-2, mTIM-4, mTIM-4 ND/AA y mTIM-4 FW/AA a una concentración final de $0,2 \mu\text{M}$. Una vez añadida la subfase en la microbalanza, se agitó suavemente mediante un pequeño imán y se depositaron sobre ella diferentes cantidades de fosfolípido disuelto en cloroformo:metanol (3:1) hasta alcanzar la tensión superficial inicial deseada (π_0). Los experimentos de inserción con las proteínas TIM se llevaron a cabo en monocapas de FS o FC a diferentes valores de presión superficial inicial, entre los 5 mN/m y los 30 mN/m. Una vez adicionado el fosfolípido, se esperó unos 10 minutos para asegurar la evaporación de la mezcla de cloroformo:metanol y la estabilización de la monocapa lipídica formada sobre la subfase. A continuación, se inyectó la proteína en la subfase y se monitorizó la variación de presión superficial para cada presión inicial ensayada de la misma manera que se hizo para los experimentos de adsorción. El valor de la presión de inserción crítica (π_c), definido como el valor máximo de π al cual la proteína es capaz de insertarse en una

monocapa, se calculó mediante la representación del incremento de presión superficial frente al valor de presión superficial inicial.

3.10. Espectros de fluorescencia intrínseca de las proteínas TIM murinas en presencia de liposomas.

Los espectros de fluorescencia realizados durante este trabajo de Tesis se llevaron a cabo en un espectrofluorímetro SLM-Aminco Bowman series 2. Para la colección de los espectros del triptófano se usó una longitud de onda de excitación de 290 nm y de emisión de 350 nm. El paso de luz utilizado para la excitación y la emisión fue en ambos casos de 4 nm. Los espectros de emisión de fluorescencia se recogieron en la región comprendida entre 300 y 450 nm a una velocidad de toma de datos de 1 nm por segundo y un paso de banda de 1 nm. Para realizar los espectros se utilizó una cubeta de cuarzo de $45 \times 12,5 \times 12,5$ mm con capacidad para 700 μ l.

Los espectros de fluorescencia intrínseca de las proteínas TIM murinas se realizaron con los dominios N-terminales de dichas proteínas expresados en bacterias y replegados *in vitro*. Las medidas se tomaron con 500 μ l de proteína a una concentración de 3 μ M disuelta en tampón de unión. Los espectros de fluorescencia intrínseca de las proteínas TIM en presencia de liposomas se llevaron a cabo con LUVs (Large Unilamellar Vesicles) de 100 nm de tamaño con una composición de 100% de FS o FC, preparados por el método de extrusión, tal y como se explicó anteriormente en el apartado número 3.6, *Preparación de liposomas*.

Los experimentos de variación de la emisión de fluorescencia intrínseca del triptófano en función el tiempo se realizaron tras incubar las proteínas TIM a tiempos de 0, 10, 20, 30, 60, 90 y 120 minutos con una concentración de liposomas de 40 μ M. La variación de fluorescencia relativa (F/F_0) se calculó tomando como referencia el valor de la fluorescencia al inicio de la incubación (F_0). En paralelo, se monitorizaron los espectros en ausencia de proteína (40 μ M de liposomas en 500 μ l de tampón de unión) a los mismos tiempos de incubación. Estos espectros se tomaron como blancos y fueron sustraídos de los espectros obtenidos para las proteínas.

Los espectros de fluorescencia intrínseca de las proteínas TIM con concentraciones crecientes de liposomas se realizaron con 500 μ l de proteína a 3 μ M y concentraciones de liposomas de 0, 4, 6, 12, 40 y 80 μ M. Los liposomas se añadieron de forma sucesiva sobre una misma muestra de proteína. Los espectros se realizaron tras una hora de incubación de

la proteína con cada una de las concentraciones de liposomas. Se usó como blanco 500 μ l de tampón de unión al que se le añadieron las mismas concentraciones crecientes de liposomas usadas para las proteínas. Se realizaron los controles de dilución pertinentes, donde se añadió a las proteínas el tampón en lugar de liposomas. De esta manera controlamos la variación de fluorescencia producida por la dilución de la muestra de proteína. Los espectros mostrados para este tipo de experimentos se presentan corregidos frente al control de dilución realizado para cada una de las proteínas y con los espectros realizados como blanco sustraídos. El valor de intensidad de fluorescencia obtenido para las proteínas TIM en ausencia de liposomas fue tomado como referencia (F_0).

Los espectros de fluorescencia intrínseca de mTIM-4 en ausencia de calcio se llevaron a cabo en un tampón de unión que no contenía el catión. Sobre la muestra de proteína se añadieron liposomas de FS o FC a concentraciones crecientes de 0, 4, 6, 12, 40 y 80 μ M, y se monitorizaron los espectros tras una hora de incubación. A continuación, se añadió calcio a una concentración final de 2,5 mM sobre la incubación previa de la proteína con liposomas y se recogió de nuevo el espectro de la proteína. Los blancos y los controles de dilución permitentes se realizaron en tampón de unión sin calcio. Los espectros mostrados son el resultado de la sustracción del blanco y están corregidos con el control de dilución.

3.11. Experimentos de SPR con las proteínas TIM murinas.

Los experimentos de resonancia de plasmones de superficie (SPR) se realizaron en un BIAcore 3000TM (GE Healthcare). Para el cálculo de la afinidad de las proteínas TIM por FS mediante esta técnica utilizamos un chip L1 (GE Healthcare), apto para la inmovilización de liposomas. En los experimentos se usó un tampón con 25 mM Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl y 2,5 mM de CaCl_2 , que fue filtrado a través de un filtro de 0,22 μ m y degasificado por medio de un sonicador de baño durante 15 minutos. Inicialmente se lavaron las cuatro celdas del chip durante dos minutos a un flujo de 20 μ l/min con una solución acuosa de 20 mM CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate, Sigma- Aldrich). A continuación procedimos a la inmovilización de los liposomas en las diferentes celdas del chip. Para ello utilizamos liposomas de FS o FC que fueron preparados tal y como explicamos anteriormente en el apartado número 3.6, *Preparación de liposomas*. Los liposomas de FC se diluyeron 100 veces y los liposomas de FS unas 50 veces antes de su inyección, a un flujo de 5 μ l/min durante

aproximadamente 2 ó 3 minutos. La inyección de liposomas fue abortada cuando se inmovilizaron las unidades de resonancia (RU) deseadas sobre la superficie del chip. Tras la inmovilización de los liposomas, sometimos a la superficie a dos lavados sucesivos con hidróxido sódico (NaOH) a un flujo de 100 μ l/min durante 30 segundos para estabilizar la superficie. El primer lavado se realizó con NaOH a una concentración de 10 mM y el segundo lavado con una concentración de 100 mM.

3.11. 1. Cálculo de las cinéticas de unión y afinidad de las proteínas TIM por FS mediante SPR.

Para el cálculo de las cinéticas de unión a FS y las afinidades de las proteínas TIM en el BIAcore usamos los dominios N-terminales de las proteínas TIM murinas obtenidos en bacteria mediante replegamiento *in vitro*. Se estudiaron las proteínas mTIM-1, mTIM-3, mTIM-4 y mTIM-2, control negativo de la interacción ya que no une FS, así como los mutantes mTIM-4 ND/AA y mTIM-4 FW/AA. En cada uno de los experimentos se inyectó un rango de concentraciones de proteína, desde 0,1 a 6 μ M. Las proteínas se diluyeron en el tampón Hepes con calcio descrito anteriormente y se inyectaron a través de las superficies del chip con liposomas a diferentes flujos. Tras las fases de asociación y disociación de las proteínas del chip con liposomas se procedió a regenerar la superficie con tampón Hepes que contenía 25 mM de EDTA, quelante que inhibe la interacción de las proteínas TIM con FS. Se realizaron sucesivos ciclos de asociación y disociación de las proteínas a liposomas, seguidos por la regeneración de la superficies, que fueron estables durante 24-48 hs.

El cálculo de las cinéticas y afinidad de las diferentes proteínas TIM por liposomas de FS se realizó con datos obtenidos en experimentos realizados con diferentes tipos de superficie y distintos flujos. En un primer grupo de experimentos se inmovilizaron en el chip L1 aproximadamente 3000 RU de liposomas con una composición del 100% de FS o FC, esta última como control de unión inespecífica, se inmovilizó en la celda 1 del chip. En el segundo grupo de experimentos utilizamos superficies similares con 500 RU de liposomas inmovilizamos. En un tercer grupo de experimentos se inmovilizaron 1000 RU de liposomas con una composición mixta en todas las celdas del chip. En la celda 1 se inmovilizaron liposomas con un 100% de FC, celda control y referencia, y en las otras celdas liposomas preparados con una mezcla de FS y FC, con una proporción creciente de FS (5%, 10% y 25%). La inyección de las proteínas se llevó a cabo simultáneamente a

través de todas las celdas con liposomas inmovilizados a flujos de 10, 30 y 60 $\mu\text{l}/\text{min}$. Las curvas de interacción (sensogramas) monitorizados para la superficie control con 100% FC se sustrajeron de las curvas monitorizadas para las superficies con FS para su posterior análisis y determinación de las cinéticas de unión.

El análisis de los sensogramas y la determinación de las constantes cinéticas de unión se realizó con la versión 3.2 del programa BIAevaluation (66). Se analizaron las fases de asociación y disociación de las proteínas independientemente. La interacción de las proteínas mTIM-1, mTIM-3 y mTIM-4 pudo ajustarse correctamente a una interacción tipo 1:1 (Langmuir binding) en todos los casos, salvo en los sensogramas obtenidos a elevadas concentraciones de mTIM-1. Las curvas correspondientes a las concentraciones 2, 4 y 6 μM de mTIM-1 mostraron un perfil de asociación complejo, distinto de un modelo de interacción 1:1, por lo que fueron eliminadas en la mayoría de los ajustes. En los tres tipos de experimentos realizados con diferentes tipos de superficies se observaron interacciones similares para las diferentes proteínas TIM murinas con FS, aunque el ajuste de los sensogramas a una interacción tipo 1:1 fue más precisa para superficies con una baja cantidad de FS y liposomas de composición mixta de FS y FC.

3.11. 2. Cálculo de los valores termodinámicos de la interacción de las proteínas TIM murinas por FS mediante SPR.

Para el cálculo de los valores termodinámicos de la interacción, se determinaron las constantes cinéticas de unión de las proteínas TIM a liposomas de FS a cuatro temperaturas diferentes: 15, 25, 30 y 37°C. La energía libre de Gibbs (ΔG) de la interacción para cada proteína se calculó mediante la ecuación:

$$\Delta G = -RT \ln (1/KD)$$

Donde R es la constante de los gases (8,314 J/(mol*K)), KD es la constante de disociación calculada para un rango de temperaturas y T es la temperatura en grados Kelvin (1°Kelvin= 273+°C).

La entalpía (ΔH) de la reacción de unión de las proteínas TIM a FS se calculó como la diferencia entre la energía de activación del proceso de asociación y la energía de activación del proceso de disociación ($\Delta H = E_{a\text{aso}} - E_{a\text{dis}}$). Las energías de activación para ambos procesos se calcularon mediante la ecuación de Arrhenius:

$$\ln k_{\text{aso/dis}} = \ln A - E_{a\text{aso/dis}}/(RT)$$

Donde k_{aso} o k_{dis} son las constantes cinéticas de asociación o disociación para la reacción a una temperatura T, T es la temperatura en grados Kelvin, A es una constante conocida como factor pre-exponencial y R es la constante de gases.

La entropía de la interacción se calculó con los datos de ΔG y ΔH obtenidos anteriormente mediante la ecuación de Gibbs: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.

4. RESULTADOS:

4.1. Preparación de las proteínas TIM murinas.

4.1.1. Preparación de las proteínas TIM solubles en sistemas eucariotas.

Para realizar ensayos bioquímicos y funcionales con las proteínas de la familia TIM murinas (mTIM), decidimos expresar los dominios extracelulares de dichas proteínas en células de mamífero. Para ello, clonamos los cDNAs que codifican para la región extracelular completa, dominio IgV, dominio mucina y dominio D3, en el vector pEF-Fc (Fig. 4.1A). Este vector, es un vector derivado del vector pEF-BOS (97) que contiene el DNA genómico de la porción Fc de la proteína IgG1 humana (Fc). El cDNA de las proteínas TIM que contiene el péptido señal endógeno, se clonó seguido de una señal para la trombina (LVPRGS) y una secuencia de “splicing” (GCTGAGT), de manera que se genere una proteína de fusión (TIM-Fc) y ésta se secrete al sobrenadante celular (Fig. 4.1B). Por lo tanto, las proteínas TIM-Fc son proteínas bivalentes que contienen toda la región extracelular de la proteína TIM.

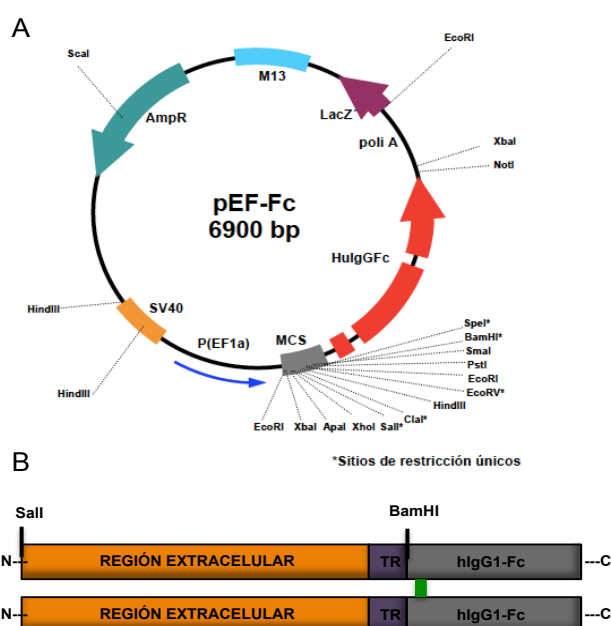


Figura 4.1 . Diseño de proteínas TIM-Fc solubles para su expresión en células de mamífero. A. Plásmido pEF-Fc utilizado para la expresión de las construcciones solubles construido a partir del plásmido pEFBOS (97). B. Esquema de las proteínas de fusión TIM-Fc que contiene región extracelular de la proteína, un sitio de reconocimiento de trombina (TR) y la porción Fc de la IgG1 humana (Fc). Un puente disulfuro en la región Fc (barra en verde) genera una proteína bivalente.

La producción de proteínas se llevó a cabo mediante transfección transitoria de células HEK-293T (52). Los sobrenadantes celulares que contenían las proteínas recombinantes se recogieron tres días después de la transfección. La concentración de proteína en dichos sobrenadantes mediante ELISA, tal y como se explica en *Materiales y*

métodos. Mediante expresión transiente se obtuvieron las variantes polimórficas HBA y BALB/c de mTIM-1 y mTIM-3, mTIM-2 y mTIM-4 (Fig. 4.2). En esta Tesis se usaron proteínas TIM-Fc de concentración conocida, en sobrenadantes celulares o parcialmente purificadas por afinidad.

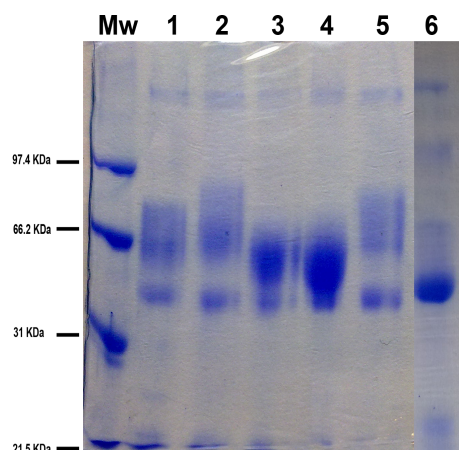


Figura 4.2. Electroforesis de las proteínas TIM-Fc murinas expresadas en células de mamífero. Gel SDS-PAGE en condiciones reductoras mostrando las proteínas mTIM-1(HBA)-Fc (1), mTIM-1(BALB/c)-Fc (2), mTIM-3(HBA)-Fc (3), mTIM-3(BALB/c)-Fc (4), mTIM-2-Fc (5) y mTIM-4-Fc (6) producidas en células HEK-293T y parcialmente purificadas por afinidad. La banda correspondiente a las proteínas expresadas se hayan señaladas con una cabeza de flecha. El Tamaño (kDa) del marcador de peso molecular (Mw) se indica a la izquierda.

4.1.2. Preparación de los dominios N-terminales de las proteínas TIM murinas solubles en un sistema bacteriano.

Con objeto de obtener cantidades sustanciales de los dominios N-terminales aislados de las proteínas TIM murinas para su cristalización y para estudios funcionales, usamos un sistema de expresión bacteriano. Este protocolo se había usado en el laboratorio previamente para la preparación de mTIM-2 y se usó, con pequeñas modificaciones, para la preparación del resto de proteínas murinas.

Tras el clonaje de los cDNAs codificantes para los dominios N-terminales de las proteínas TIM en el vector de expresión bacteriano pET-27b(+) (Novagen), tal y como se ha descrito en la sección de *Materiales y métodos*, se procedió a comprobar la expresión de las proteínas en bacterias *E. coli BL21pLys*. Se analizaron mediante electroforesis desnaturalizante los lisados de cultivos bacterianos tras inducción de la expresión de la proteína con IPTG (Fig. 4.3A). Como control de la expresión, se utilizaron lisados bacterianos no inducidos. La electroforesis de los lisados bacterianos mostró la presencia de una proteína con un peso molecular aproximado de 18 kDa en muestras inducidas, similar al esperado para los dominios N-terminales de las proteínas TIM murinas. No obstante, posteriores análisis indicaron que las proteínas se expresaban en forma insoluble, formando cuerpos de inclusión. Por lo tanto, se procedió a la preparación de los dominios N-terminales solubles mediante replegamiento *in vitro* por el método de dilución. Se

siguió un protocolo de clarificación y purificación de los cuerpos de inclusión, con el que se obtuvo una muestra libre de gran parte de contaminantes (Fig. 4.3B). Los cuerpos de inclusión solubilizados en un tampón con alta concentración de urea se diluyeron 100 veces, de forma que la disminución de la concentración de urea permitiese el repliegamiento de la proteína. La cantidad de cuerpos de inclusión a diluir es crítica y fue determinada experimentalmente para cada proteína. Si se añaden una gran cantidad de cuerpos de inclusión solubilizados, la proteína no se repliega correctamente y aparecen agregados. La cantidad de cuerpos de inclusión añadidos fue de aproximadamente 250 unidades de densidad óptica por litro de solución de repliegamiento en el caso de mTIM-1, 40 en el caso de mTIM-2, 700 en el caso de mTIM-3 y 500 en el caso de mTIM-4.

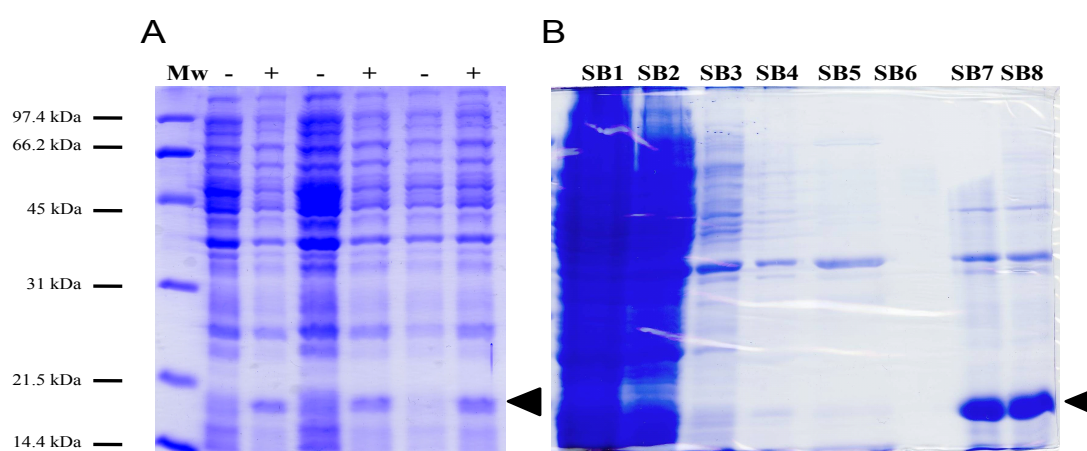


Figura 4.3: Expresión de los dominios N-terminales de las proteínas TIM murinas en un sistema bacteriano.
A. Inducción de la expresión de la proteína mTIM-4 mediante IPTG. SDS-PAGE de cultivos de clones bacterianos transformados con pET-27b(+)/mTIM-4 sin inducir (-) o inducidos con IPTG (+). La nueva proteína asociada con la inducción está señalada con una cabeza de flecha. El tamaño (kDa) del marcado de peso molecular (Mw) se indica a la izquierda. **B.** Purificación de los cuerpos de inclusión. Electroforesis de sobrenadantes (SB) de los lavados sucesivos (1-6) de los cuerpos de inclusión bacterianos, donde se aprecia la desaparición de proteínas contaminantes (*Materiales y métodos*). El SB7 y el SB8 corresponden a los cuerpos de inclusión solubilizados (proteína indicada con una flecha).

Una vez diluidas las proteínas en solución de repliegamiento, éstas se concentraron hasta tres mililitros y se sometieron a un primer paso de purificación mediante cromatografía de exclusión molecular. El objetivo fue eliminar toda la proteína no plegada apropiadamente o agregada, además de otras proteínas contaminantes todavía presentes en la muestra. En todos los casos se observó en el cromatograma un pico con un volumen de exclusión correspondiente a la proteína monomérica (18 kDa) y cierta muestra agregada con un volumen de exclusión menor, correspondiente a agregados moleculares (Fig. 4.4). El rendimiento de repliegamiento para cada una de las proteínas, estimado como la

relación entre la muestra de proteína monomérica y agregados, fue de aproximadamente un 85% para mTIM-1, un 70% para mTIM-2 y mTIM-3 y un 90% en mTIM-4.

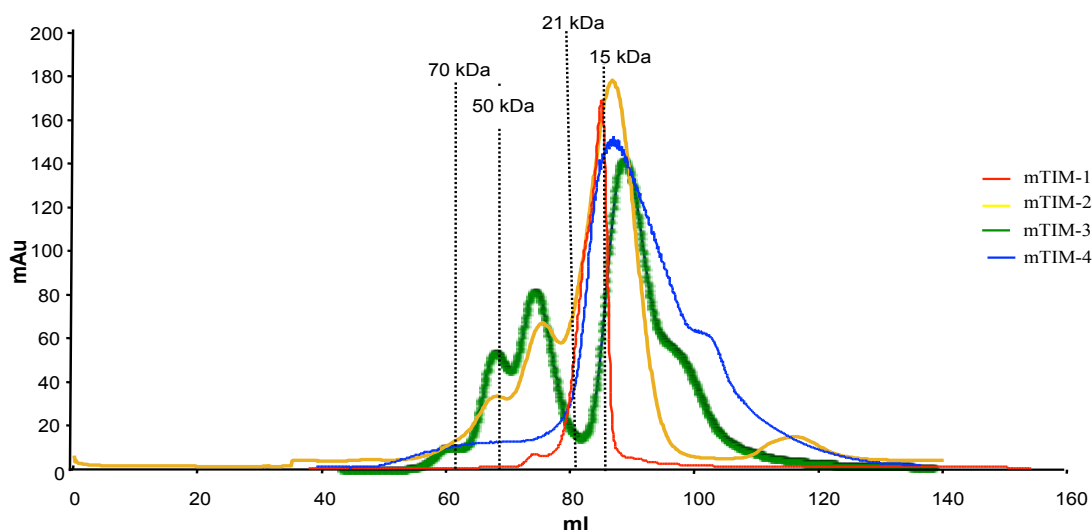


Figura 4.4: Exclusión molecular de los dominios N-terminales solubles de las proteínas TIM murinas. Cromatogramas de los dominios de mTIM-1, mTIM-2, mTIM-3 y mTIM-4 obtenidos por repliegamiento *in vitro*. Volumen de exclusión respecto de la absorbancia. Las líneas punteadas indican el volumen de exclusión marcadores de peso molecular utilizados para el calibrado de la columna.

Tras la cromatografía de exclusión molecular, se tomaron las fracciones que contenían la mayor parte de la proteína soluble y se sometieron a sucesivos procesos de purificación. Para la preparación de muestras para cristalografía, las proteínas se trataron con trombina durante 15 horas a 25°C. De esta manera, se eliminó el epítipo HSV y las colas de histidina presente en el extremo C-terminal de las proteínas. La digestión con trombina se comprobó mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (Fig. 4.5A). Para su posterior purificación por intercambio iónico, las proteínas mTIM-1, mTIM-2 y mTIM-3 se dializaron frente a un tampón con un pH con al menos dos puntos por debajo de su punto isoelectrico ($pI_{mTIM-1} = 6,41$, $pI_{mTIM-2} = 6,58$ y $pI_{mTIM-3} = 6,24$). De esta manera, la proteínas presentan una carga positiva y se unen a columnas de intercambio catiónico. mTIM-4 presenta un punto isoelectrico de 9,36, superior al pH neutro de la muestra de la proteína, así que no fue necesario dializarla para su purificación por intercambio iónico.

En un segundo proceso de purificación, mTIM-1, mTIM-3 y mTIM-4 fueron separadas de contaminantes mediante cromatografía de intercambio catiónico usando una columna SP-Sefarosa. Por el contrario, mTIM-2 se purificó con una columna de

intercambio aniónico monoQ-Sefarosa siguiendo los procedimientos descritos en *Materiales y métodos*. En algunos casos, el tampón de las muestras de proteína fue reemplazado por tampón Hepes-salino (10 mM Hepes con 100 mM NaCl) pH 7,5, mediante diálisis o mediante el uso de concentradores de proteínas. La concentración de la proteína se determinó mediante la medida de la densidad óptica a 280 nm, y su pureza fue estimada por medio de electroforesis (Fig. 4.5B). Para determinar la integridad y el correcto plegamiento de las proteínas obtenidas, se comprobó que éstas eran reconocidas específicamente por anticuerpos monoclonales que reconocen a las proteínas nativas (no mostrado).

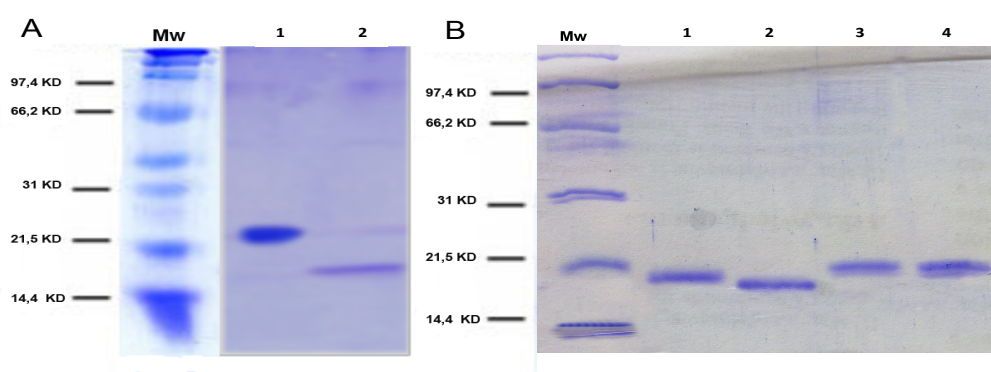


Figura 4.5. Tratamiento con trombina de los dominios N-terminales de las proteínas TIM murinas y fracciones proteicas obtenidas tras la purificación por cromatografía de intercambio iónico. A. Tratamiento con trombina de los dominios N-terminales de las proteínas TIM. PAGE-SDS en condiciones reductoras mostrando la proteína mTIM-4 sin tratar (1) y tratada con trombina (2). **B.** Electroforesis de los dominios N-terminales de las proteínas TIM murinas purificadas. PAGE-SDS en condiciones reductoras mostrando los dominios N-terminales replegados *in vitro* y purificados de las proteínas mTIM-1 (1), mTIM-2 (2), mTIM-3 (3) y mTIM-4 (4). El Tamaño (kDa) del marcador de peso molecular (Mw) se indica a la izquierda.

Los dominios N-terminales de las proteínas TIM expresados en bacteria y replegados en *in vitro* se usaron durante este trabajo de Tesis en experimentos de espectroscopía de fluorescencia y, en ensayos de BIAcore y de cristalización. En este último caso, las proteínas se concentraron hasta una concentración aproximada de 20 mg/ml y la concentración salina se ajustó a 100 mM durante el proceso de purificación.

4.2. Estructura cristalográfica de los dominios N-terminales de las proteínas TIM-3 y TIM-4 murinas.

4.2.1. Cristalización y determinación de la estructura del dominio N-terminal de mTIM-4.

Tras la preparación y purificación del dominio N-terminal de mTIM-4, procedimos a su cristalización. Para ello se siguió el mismo método que se había usado previamente en el laboratorio con mTIM-1 y mTIM-2 (129), por lo que inicialmente se ensayaron condiciones de cristalización similares a las utilizadas anteriormente para mTIM-1 (129). De hecho, mTIM-4 se cristalizó inicialmente por el método de gota colgante en la misma condición de cristalización que mTIM-1 con la adición de O-octilfosforil Colina (O-(n-Octyl)-phosphorylcholine), un detergente presente en un kit comercial (Detergent Screening Kit, SIGMA). La condición de cristalización presenta una alta concentración de Polietilenglicol (30% de PEG-2000 metil-éter), por lo que para la congelación de los cristales se usó una solución de cristalización que contenía tan sólo un 5% de glicerol como crioprotector. Los cristales se montaron en criolazos y se transportaron congelados al sincrotrón del ESRF para la colección de datos cristalográficos en las diferentes líneas de cristalografía de macromoléculas.

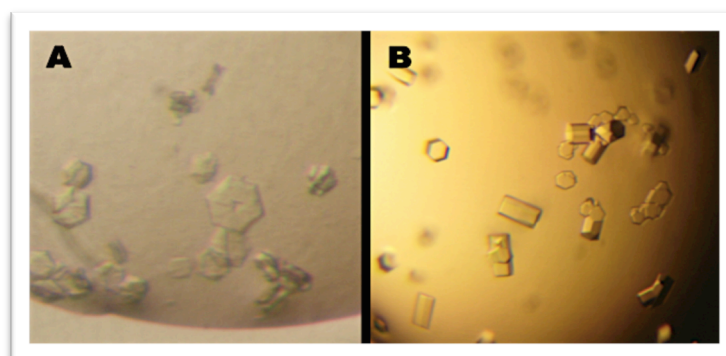


Figura 4.6. Cristales del dominio N-terminal de mTIM-4. A. Cristales pertenecientes a la forma cristalográfica. B. Cristales de la forma cristalográfica X2.

Los cristales de mTIM-4 pertenecen al grupo espacial P321, contienen una molécula en la unidad asimétrica y un 55% de solvente (Fig. 4.6A). A esta primera forma cristalográfica obtenida para mTIM-4 la denominamos forma cristalográfica X1. Con objeto de mejorar los cristales de mTIM-4, se realizó una búsqueda de nuevas condiciones de cristalización contenidas en kits comerciales. Esta búsqueda, dio como resultado la obtención de unos cristales de mTIM-4 (forma cristalográfica X2) de mayor tamaño, con

una condición de cristalización con una elevada concentración de tartrato de sodio y potasio como precipitante (0,8 M). Para su congelación, se usó solución de cristalización con un 20% de etilenglicol como crioprotector. Los datos de difracción se colectaron en las líneas de sincrotrón del ESRF. Estos cristales, que presentaban forma de prismas hexagonales, pertenecen al grupo espacial $P6_322$, tienen una molécula en la unidad asimétrica y un 63% de solvente (Fig. 4.6B).

Los datos de difracción fueron indexados e integrados con el programa XDS (60). La determinación de las estructuras de las formas cristalográficas de mTIM-4, se llevaron a cabo mediante el método de reemplazo molecular usando el programa PHASER (89, 101) y la estructura de mTIM-2 como modelo. La forma cristalográfica X1 fue refinada con el programa CNS (9), mientras que la forma cristalográfica X2 se refinó con el programa REFMAC (101). Durante el proceso de refinamiento los modelos fueron ajustados manualmente. Las estadísticas del refinamiento para ambas formas cristalinas se presentan en la Tabla 4.1. Los dos primeros residuos N-terminales y los cuatro últimos C-terminales de estas estructuras, presentaron cierta flexibilidad y no pudieron trazarse en algunas de las moléculas. No obstante, todos los residuos incluidos en los modelos finales se encuentran en posiciones permitidas del diagrama de Ramachandran.

4.2.2. Estructura del dominio N-terminal de mTIM-4.

La estructura de la forma cristalográfica X1 de mTIM-4 mostró que el dominio N-terminal rico en cisternas adoptaba un plegamiento tipo inmunoglobulina (Ig) del tipo variable (IgV), muy similar al que se había descrito para mTIM-1 (129). El dominio IgV de mTIM-4 presenta dos láminas β , la lámina β BED y la GFC, que formaban una estructura de sándwich β . Las hebras de la lámina β BED son particularmente cortas y están unidas por largos lazos, mientras que en la cara opuesta, las hebras A, G, F, C y C' que forman la lámina β GFC son más largas (Fig. 4.7A). Un residuo conservado de Pro anterior al primer residuo de cisteína del dominio, podría ser el representante de la menor longitud de la hebra β B. El primer y último residuo de cisteína de este dominio forma un puente disulfuro interno que une el sándwich β como ocurre en la mayoría de los dominios tipo Ig (7), mientras que los otros cuatro residuos de cisteína característicos de la familia TIM forman dos puentes disulfuro externos que unen la parte inferior del largo lazo CC' a la lámina β GFC. La zona inferior del largo lazo CC' se encuentra unido a la lámina β GFC mediante dos puentes disulfuro formados por las cuatro cisteínas extra que presentan

las proteínas TIM en su dominio IgV (Fig. 4.7). El vértice del lazo CC' se encuentra conectado a la lámina β mediante puentes de hidrógeno con las cadenas laterales de los residuos básicos Arg88 y Lys99, situados en las hebras β F y G, respectivamente (Fig. 4.7A). La conformación del lazo CC' en mTIM-4 es muy similar a la similar a la de mTIM-1 (Fig.4.7B), proteína que también contiene los dos residuos básico en las hebras β F y G.

La secuencia del lazo FG de mTIM-4 es muy similar al de mTIM-1, ambos presentan en la zona superior del lazo FG dos residuos aromáticos (Trp y Phe). En la estructura de mTIM-1, el residuo de Phe del lazo FG se haya dispuesto hacia en lazo CC', de manera que ambos lazos aparecen conectados (Fig. 4.7B). Sin embargo, en la estructura de mTIM-4 los lazos CC' y FG aparecen desconectados debido a un cambio conformacional de la cadena lateral del residuo de Phe, de manera que se crea una pequeña cavidad formada por los lazos CC' y FG (Fig. 4.7B). Esta cavidad está formada en la parte inferior por el vértice del lazo CC' y los residuos básicos a los que está conectado, y en la parte superior, por los residuos aromáticos de Trp y Phe del lazo FG.

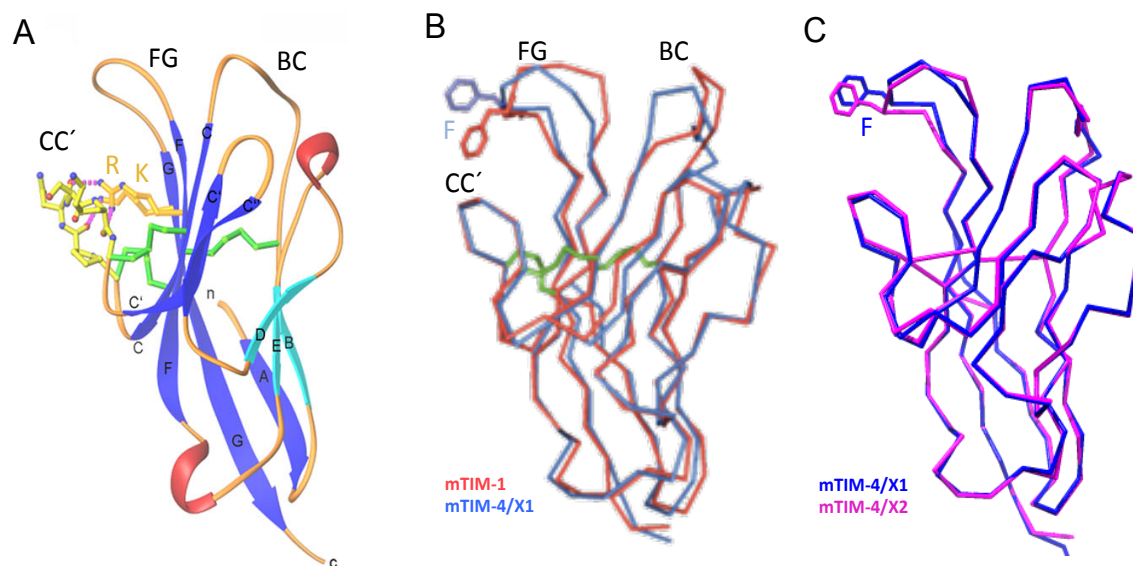


Figura 4.7: Estructura cristalográfica del dominio N terminal de mTIM-4. **A.** Diagrama tipo ribbon de la estructura del dominio IgV de mTIM-4 (Forma cristalina X1). Las láminas β y los lazos de la parte superior del dominio están indicados en mayúsculas, mientras que los extremos N y C terminales están señalados en minúsculas. Los residuos de cisteína y los puentes disulfuro se muestran en verde. Los residuos situados entre los dos puentes disulfuro en el lazo CC' se representan con barras y bolas en amarillo. Los residuos Arg88 (R) y Lys99 (K) que anclan el lazo CC' a las hebras β F y G, respectivamente, se muestran en naranja. Los puentes de hidrógeno se representan en cilindros discontinuos rosas. **B.** Vista de las estructuras sobrepuestas de los dominios IgV de mTIM-1 (rojo) y mTIM-4 (azul) cristalizadas en condiciones muy similares. Se incluyen las cadenas laterales de Phe con distinta conformación en el lazo FG. **C.** Vista de las estructuras sobrepuestas de los dominios IgV de mTIM-4/X1 (azul) y mTIM-4/X2 (magenta). Se muestran las cadenas laterales del residuo Phe96 de ambas estructuras.

La estructura de la segunda forma cristalográfica de mTIM-4 (mTIM-4 X2), cristalizada en una condición de cristalización con una concentración elevada de tartrato, era prácticamente idéntica a la de la forma cristalográfica X1 (Fig. 4.7C). El anillo aromático del residuo de Phe en el lazo FG también se encuentra alejado del lazo CC', de manera que ambos lazos están desconectados, como ocurría en la forma cristalográfica X1.

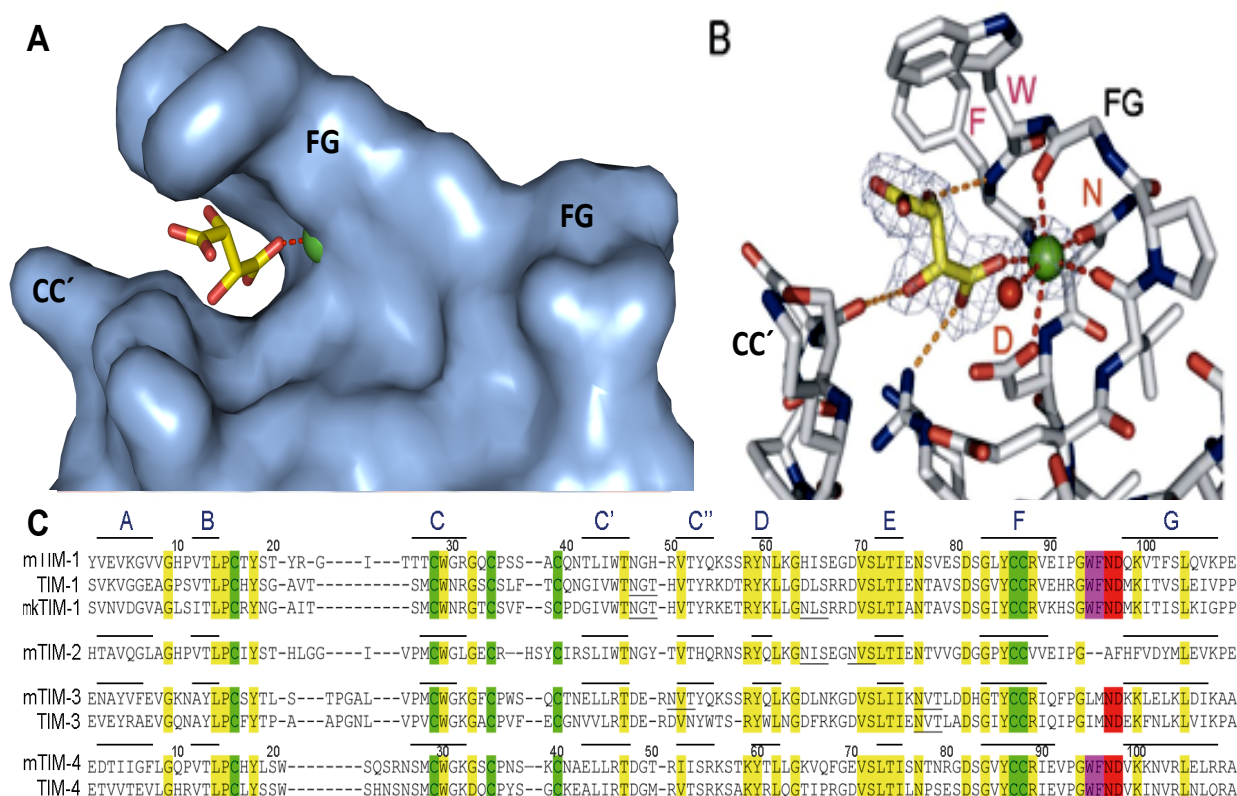


Figura 4.8: Sitio de coordinación de metal del lazo FG del dominio IgV de mTIM-4. **A.** Representación de la superficie de la zona superior del dominio IgV de la forma cristalina X2. El tartrato se muestra con los carbonos en amarillo y los oxígenos en rojo. El átomo de sodio al que esta coordinado el tartrato se muestra en verde. En la proteína los oxígenos están representados en rojo, los nitrógenos en azul y los carbonos en gris. Se marcan los lazos. **B.** Vista detallada del sitio de coordinación del ión metálico. El ión (esfera verde) se encuentra coordinado con el tartrato, con oxígenos de la cadena principal y lateral de residuos del lazo FG, y con una molécula de agua (esfera roja). Se muestra el mapa de densidad Fo-Fc para el tartrato y el ión metálico. Los enlaces de hidrogeno se representan como líneas discontinuas en naranja y las coordinaciones en rojo. **C.** Alineamiento de los dominios IgV de las proteínas TIM murinas. Las láminas β están marcadas con líneas, los residuos conservados están en amarillo y las cisteínas en verde. Los sitios potenciales de N-glicosilación están subrayados. Los sitios de coordinación con el catión en mTIM-4 están en rojo, y los residuos aromáticos del lazo FG que forman la cavidad están coloreados en magenta. Las proteínas TIM humanas y de mono están alineadas por secuencia.

Gracias a la alta resolución conseguida con estos cristales, pudimos observar la presencia de una molécula de tartrato en el interior de la cavidad formada por los lazos CC' y FG (Fig. 4.8A). El tartrato formaba enlaces de hidrogeno con varios residuos de la proteína (Fig. 4.8B). El grupo carboxilato del tartrato también estaba coordinado a un ión

metálico, que a su vez mantenía una coordinación octaédrica con una molécula de agua y con varios residuos conservados de la proteína (Fig. 4.89B). Los residuos proteicos que coordinan con el metal (Asn y Asp), así como la conformación del lazo CC' que modela la cavidad, están conservados en todas las proteínas de la familia TIM, excepto en mTIM-2 (Fig. 4.8C), lo que sugiere que este sitio de unión a ligando dependiente de ión metálico (metal ion-dependent ligand binding site, MILIBS) identificado en la estructura de mTIM-4, debe de estar conservado en las proteínas TIM.

4.2.3. Cristalización y determinación de la estructura del dominio N-terminal de mTIM-3.

Para la cristalización de mTIM-3 se probaron condiciones de cristalización cercanas a aquellas usadas para otras proteínas TIM (129). Los cristales de mTIM-3, se obtuvieron mediante el método de gota sentada en una condición de cristalización con un elevado contenido de PEG-2000 metil-éter, similar a la anteriormente usada para mTIM-1 y la forma cristalográfica X1 de mTIM-4. Previo a su congelación, los cristales de mTIM-3 se transfirieron a una solución de cristalización que contenía 5% glicerol como crioprotectante, se montaron en criolazos y se transportaron congelados en nitrógeno líquido a las líneas de sincrotrón del ESRF para la colección de datos cristalográficos. Estos cristales, que forman agrupaciones de barras, pertenecen al grupo espacial $P2_1$, presentan una molécula en la unidad asimétrica y un 43% de solvente (Fig. 4.9).

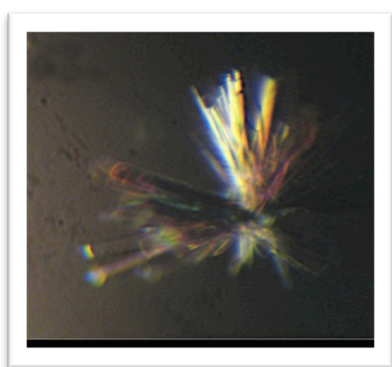


Figura 4.9. Cristales del dominio N-terminal de mTIM-3. Cristales con forma de barras crecidos en agrupaciones del dominio N-terminal de mTIM-3.

La determinación de la estructura cristalográfica de mTIM-3 se llevó a cabo mediante el método de reemplazo molecular usando el programa PHASER (89, 101) y un modelo derivado de una estructura del mismo dominio de mTIM-3 resuelta con anterioridad (PDB ID 2OYP)(10). Durante el proceso de refinamiento, el modelo se ajustó

a los mapas de densidad electrónica manualmente y con el programa Phenix.refine (147). Las estadísticas del modelo final se presentan en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Estadísticas de los datos cristalográficos y del refinamiento de las estructuras. Estadísticas de los datos de difracción y refinamiento de las estructuras cristalográficas de mTIM-4, formas X1 y X2, y mTIM-3. Las estadísticas para el rango de más alta resolución de los datos cristalográficos obtenidos con SCALA (18) se muestran en paréntesis.

	mTIM-4 X1	mTIM-4 X2	mTIM-3
COLECCIÓN DE DATOS			
Grupo espacial	P321	P6322	P21
Dimensiones celda			
a, b, c (Å)	65.3, 65.3, 57.0	67.8, 67.8, 129.1	29.9, 36.6, 54.9
α, β, γ (°)	90, 90, 120	90, 90, 120	90, 104, 90
Longitud de onda	0.9310	0.9310	0.97934
Resolución (Å)	25-2.95	25-2.2	25-2.6
Rsym or Rmerge	10.9 (27.2)	5.7 (21.1)	16.7 (24.7)
I / σ I	6.7 (2.8)	10.5 (3.6)	2.1 (2.0)
Compleitud (%)	98.3 (98.3)	99.9 (99.9)	99.0 (95.7)
Redundancia	5.2 (4.0)	20.2 (19.3)	3.2 (2.3)
REFINAMIENTO			
Resolución (Å)	15-2.95	15-2.2	15-2.6
No. Reflexiones	3036	9009	3532
Rwork / Rfree	23.6/26.8	21.8/23.8	19.4/23.9
No. átomos			
Proteína (A/B)	893	864	928
Ligando/iones	12/0	10/1	0/0
Agua	11	80	33
B-factor			
Proteína	27	25	21
Ligando/iones	12/-	16/15	-/-
Agua	18	29	23
Desviaciones r.m.s.			
Bond lengths (Å)	0.008	0.008	0.005
Bond angles (°)	1.763	1.110	0.875

4.2.4. Estructura del dominio N terminal de mTIM-3.

La estructura del dominio N-terminal de mTIM-3 rico en cisternas mostró un plegamiento tipo IgV, similar al descrito para mTIM-4 anteriormente (129). El dominio IgV de mTIM-3 presenta dos láminas β , en las que la lámina β BED contiene hebras relativamente más cortas que la lámina GFC (Fig. 4.10A). Las dos láminas β antiparalelas se disponen de manera que forman un sándwich β , unido por un puente disulfuro formado entre el primer y último residuo de cisteína de este dominio, mientras que los otros cuatro residuos de cisteína característicos de la familia TIM forman dos puentes disulfuro externos, que unen la parte inferior del largo lazo CC' a la lámina β GFC. La parte central del lazo CC' presenta una conformación fijada a la lámina β por la interacción con dos residuos básicos (Arg86 y Lys97) de las hebras F y G (Fig.4.10A), tal y como se describió

para mTIM-4 (Fig. 4.7A). La parte superior del lazo CC' de mTIM-3 presenta un residuo aromático de Trp (Trp38) dispuesto hacia el lazo FG, de manera que el lazo FG aparece conectado con el lazo CC' como en el dominio N-terminal de mTIM-1 (Fig. 4.10B). El lazo FG de mTIM-3 carece de los residuos aromáticos que presentan mTIM-1 y mTIM-4, aunque sí presenta los residuos de Asn94 y Asp95 conservados en dichas proteínas (Fig. 4.10D). La conformación de los lazos CC' y FG son muy similares en TIM-3 y TIM-4, mientras que se observan diferencias significativas en el lazo BC que decora la parte superior del dominio (Fig. 4.10C).

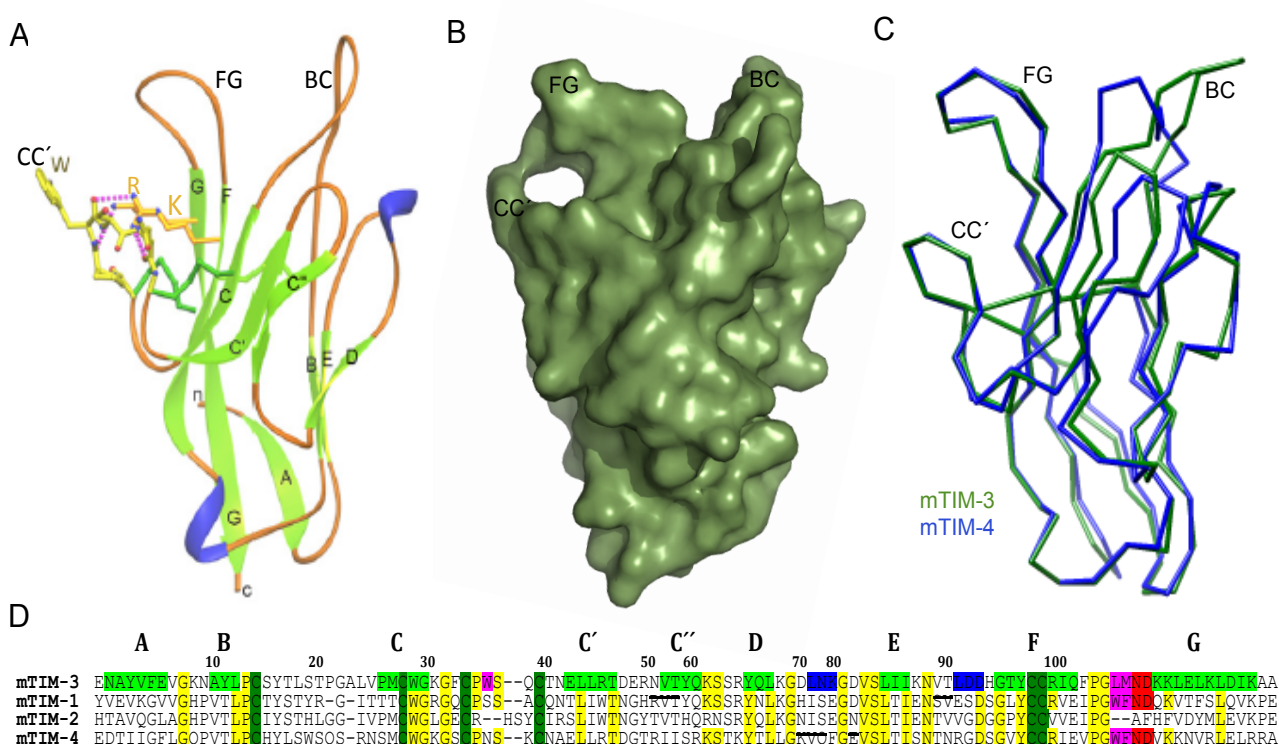


Figura 4.10 : Estructura cristalográfica del dominio N-terminal de mTIM-3. A. Diagrama tipo ribbon de la estructura del dominio IgV de mTIM-3. Las láminas β y los lazos están marcados con mayúsculas mientras que los extremos N y C terminales se marcaron en minúsculas. Los residuos de cisteína y los puentes disulfuro se muestran en verde oscuro. Las láminas β se muestran en verde y las zonas helicoidales en azul. La zona central del lazo CC' se representa con los residuos de Pro 37, Trp38 y Ser39 en modelo de barras y esferas con los carbonos coloreados en amarillo, los oxígenos en rojo y los nitrógenos en azul. Los residuos de Arg86 (R) y Lys97 (K) en las hebras F y G que interaccionan con el lazo CC' se muestran con carbonos en naranja y los puentes de hidrógeno como cilindros discontinuos en rosa. **B.** Representación de la superficie de mTIM-3. Se muestra como los lazos CC' y FG aparecen conectados debido a la disposición de la cadena lateral del Trp38 del lazo CC' y de la Met93 del lazo FG. **C.** Vista de las estructuras superpuestas de los dominios IgV de mTIM-3 (verde) y mTIM-4/X1 (azul). **D.** Alineamiento de las secuencias de los dominios N-terminales de las proteínas TIM murinas. La secuencia de mTIM-3 se haya coloreada como en A. Los residuos conservados aparecen resaltados en amarillo, las cisteínas en verde, los residuos Asn y Asp en el lazo FG aparecen en rojo y los residuos aromáticos en los lazos CC' y el FG en magenta.

4.3. Variabilidad conformacional en el dominio IgV de las proteínas TIM.

4.3.1. Conformación del lazo CC' en dominios IgV de las proteínas TIM y otras proteínas homólogas de la superfamilia de las inmunoglobulinas.

El lazo CC' de otros dominios IgV de proteínas celulares de membrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF), presenta gran variabilidad tanto en longitud como en conformación. Una de las peculiaridades de los dominios IgV de las proteínas TIM es su alto contenido en residuos de Cys. Estas proteínas contienen seis Cys, mientras que la mayoría de los dominios IgV sólo contienen dos. Una característica única de los dominios IgV de las proteínas TIM es la unión covalente del lazo CC' a la lámina β GFC por dos puentes disulfuro formados por las cuatro cisteínas extra que contienen (Fig. 4.7 y 4.9). Así pues, este lazo no presenta una conformación extendida como la que presentan la mayoría de las proteínas homólogas de la IgSF, como ocurre por ejemplo en el caso del receptor CAR (155), sino que se encuentra replegado sobre la lámina β GFC, adoptando una conformación similar a la que presenta este lazo en el dominio homólogo del receptor CEA (146) (Fig. 4.11A y C), aunque en este caso el lazo no se encuentra unido covalentemente a la lámina β . En los dominios IgV comúnmente presentes en proteínas de membrana, la lámina β GFC suele ser la zona de unión a ligandos (5, 76). Debido a la conformación replegada del lazo en las proteínas TIM, la accesibilidad de la lámina β GFC para la unión a posibles ligandos se ve reducida. Como consecuencia de esta conformación, las proteínas TIM usarán la zona correspondiente al lazo CC' en vez de la superficie de la lámina β GFC para unirse a ligandos, tal y como se ha descrito para el receptor CEA (144, 146).

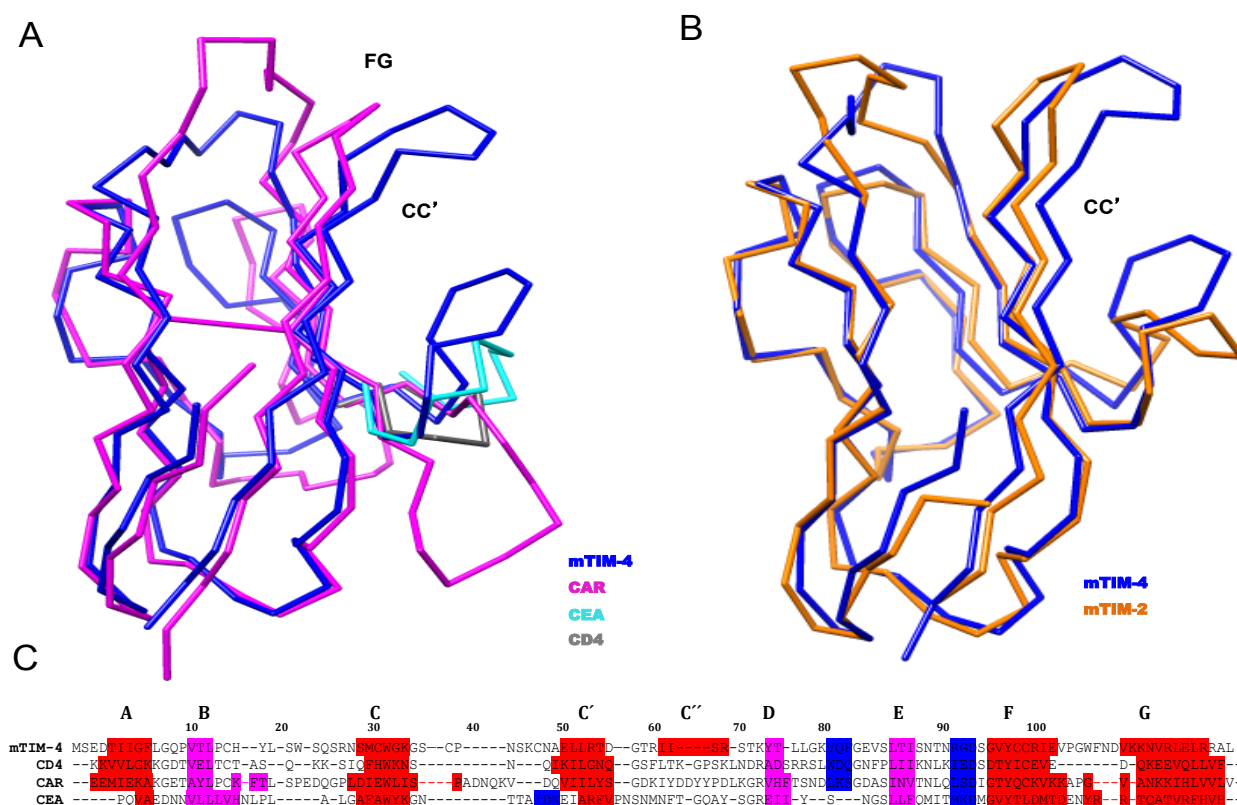


Figura 4.11 . Conformación del lazo CC' en los dominios IgV de proteínas mTIM y en otras proteínas homólogas de la IgSF. Superposición de las estructuras de los dominios IgV de mTIM-4, CAR (PDB ID 1F5W), CEA (PDB ID 1L6Z) y CD4 (PDB ID 1CGH) (**A**) y de los dominios IgV de mTIM-4 y de mTIM-2 (**B**) **C**. Alineamiento de secuencias basado en la superposición de las estructuras de los dominios IgV mostrados en A. Las láminas β se muestran en rojo las de una de las caras y en rosa las de la cara opuesta, las regiones helicoidales se muestran en azul. El alineamiento se hizo con MODELLER (33). Los residuos alineados tenían sus C α a menos de 5 Å.

4.3.2. Variabilidad conformacional de los lazos CC' y FG en las proteínas TIM murinas.

En todos los dominios IgV de las proteínas TIM de estructura conocida el lazo CC' está fijado a la lámina β GFC por dos puentes disulfuro (Fig. 4.12A). Así mismo, todas las proteínas TIM, excepto mTIM-2, tienen en su dominio IgV dos residuos básicos, una Arg y una Lys en las hebras F y G, respectivamente, que conectan la región central del lazo CC' a la lámina β GFC (Fig. 4.12A). Las cadenas laterales de estos residuos básicos forman puentes de hidrógeno con varios carbonilos de la cadena principal del lazo CC', fijando la conformación de la región central del lazo, cuyo vértice está dispuesto hacia la parte superior del dominio (Fig. 4.12A). Sin embargo, en mTIM-2, que carece de los residuos básicos, las interacciones de van der Waals entre los residuos del lazo CC' y los

de la lámina β GFC no son suficientes para fijar la conformación del lazo, cuyo vértice es relativamente flexible y presenta una conformación helicoidal única (Fig. 11B y 12A).

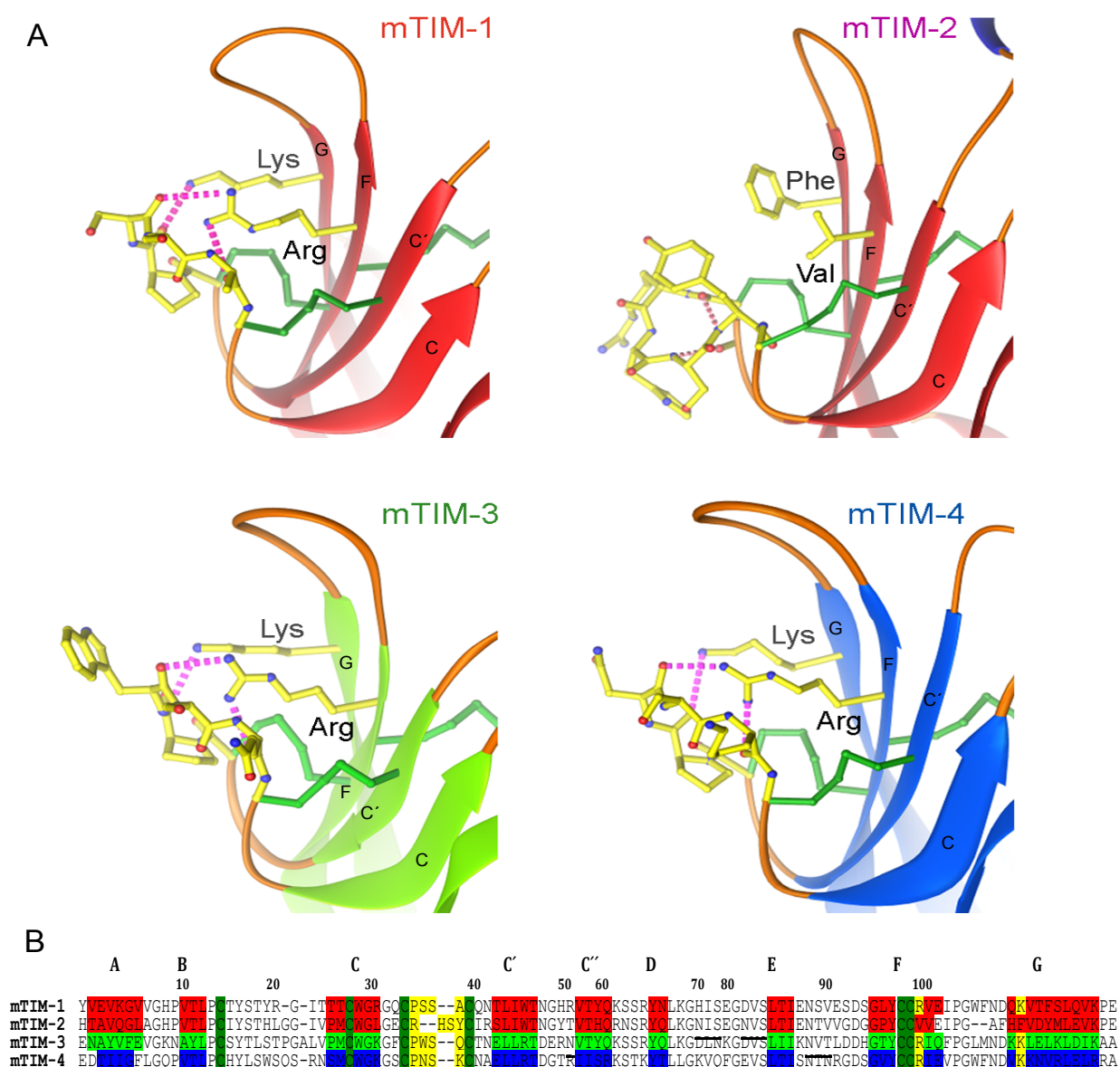


Figura 4.12 . Conformación del lazo CC' en las estructuras de las proteínas TIM. **A.** Visión detallada del lazo CC' de las cuatro proteínas murinas de la familia TIM cuya estructura es conocida (PDB ID 2OR8, 2OR7, 3KAA y 3BI9). Las hebras β aparecen señaladas. Los residuos de la zona central del lazo CC' comprendidos entre las dos cisteínas, así como los residuos de la lámina β GFC con los que interacciona, se muestran en modelo de bolas y barras con los carbonos coloreados en amarillo, los oxígenos en rojo y los nitrógenos en azul. Los puentes de hidrógeno entre los residuos básicos conservados de Arg y Lys y los residuos de la zona superior del lazo CC' se representan con una línea de puntos rosa. **B.** Alineamiento de las secuencias de los dominios IgV de las proteínas TIM murinas. Las hebras β , las cisteínas y los residuos implicados en la interacción entre el lazo CC' y la lámina β se muestran como en A.

La secuencia polipeptídica del lazo FG, comprendido entre las hebras F y G, está conservada en TIM-1 y en TIM-4 humano y murino (Fig. 4.10C). En TIM-3 humano y murino el lazo FG mantiene la longitud, pero sus secuencias polipeptídicas son diferentes a las de TIM-1 y TIM-4. En la estructura del dominio IgV de mTIM-1 los lazos CC' y FG están conectados por la cadena lateral de un residuo de Phe localizado en el lazo FG (Fig. 4.13). Este residuo está conservado en mTIM-4, pero presenta una conformación en la que su cadena lateral se encuentra alejada del lazo CC', de forma que se genera una cavidad en la parte superior del dominio IgV formada por los lazos CC' y FG. En cambio, TIM-3 no contiene ningún residuo aromático en el lazo FG, pero sí en el lazo CC'. En la estructura del dominio IgV de mTIM-3, la cadena lateral del residuo Trp38 del lazo CC' está dispuesta hacia el lazo FG, de forma que une ambos lazos tal y como se observa con la Phe95 en la estructura de mTIM-1 (Fig. 4.13).

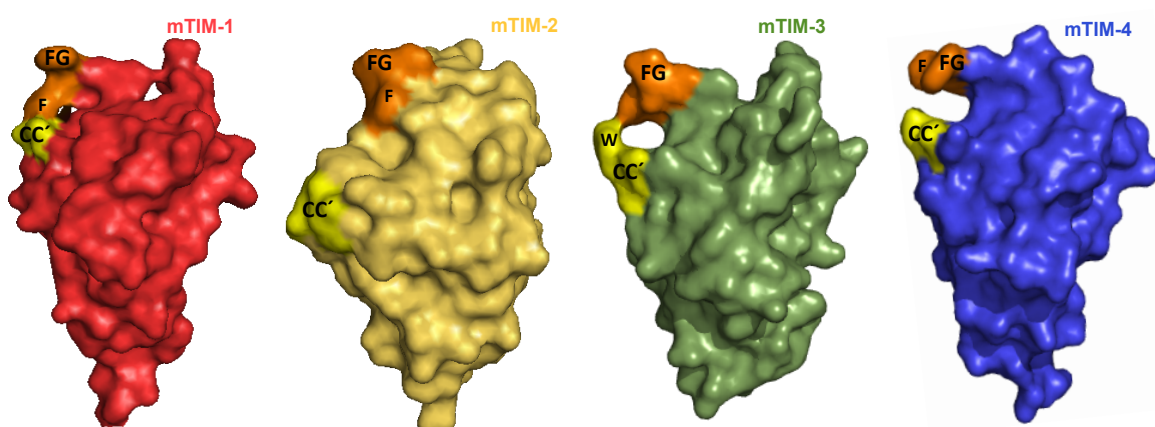


Figura 4.13. Conformación del motivo formado por los lazos FG y CC' (CC'FG) en las proteínas TIM murinas. Representación de superficie de las estructuras del dominio IgV de mTIM-1 (rojo), mTIM-2 (amarillo), mTIM-3 (verde) y mTIM-4 (azul). El lazo CC' se ha coloreado en amarillo y el lazo FG en naranja. Los residuos de Phe (F) del lazo FG de mTIM-1, mTIM-2 y mTIM-4 así como el residuo de Trp (W) de mTIM-3 aparecen señalados.

4.4. Caracterización de las proteínas TIM como receptores de fosfatidilserina.

4.4.1. Unión de las proteínas TIM murinas a fosfatidilserina en membranas.

Experimentos realizados por un grupo colaborador durante el transcurso de este trabajo de Tesis, indicaron que TIM-1 y TIM-4 reconocían FS expuesta en la superficie de células apoptóticas (71). Para estudiar esta interacción paralelamente en nuestro

laboratorio, realizamos ensayos de unión de las proteínas TIM murinas expresadas en células de mamífero con liposomas que contenían FS. Estas proteínas contienen toda la región extracelular de las proteínas TIM (dominio IgV, mucina y D3) fusionadas a la porción Fc de la proteína IgG humana (TIM-Fc). Estos experimentos fueron realizados tal y como se explica en *Materiales y métodos*.

En primer lugar, realizamos ensayos de unión a liposomas de FS y FC de las cuatro proteínas TIM murinas a diferentes concentraciones. De esta manera, observamos cómo mTIM-1 y mTIM-4 presentan una unión similar a FS, mientras que mTIM-3 presenta una actividad de aproximadamente un 50% menor. Por el contrario, mTIM-2 no se unía a FS (Fig. 4.14A). Así mismo, ninguna de las proteínas de la familia TIM presentó unión a FC en liposomas, así que decidimos usar liposomas de FC como control negativo de la interacción. De manera que todos los ensayos de unión a liposomas de FS se realizaron en paralelo con ensayos de unión a liposomas de FC y se restaron los valores de unión inespecíficos de la superficie control a los valores de unión específica obtenidos con liposomas de FS.

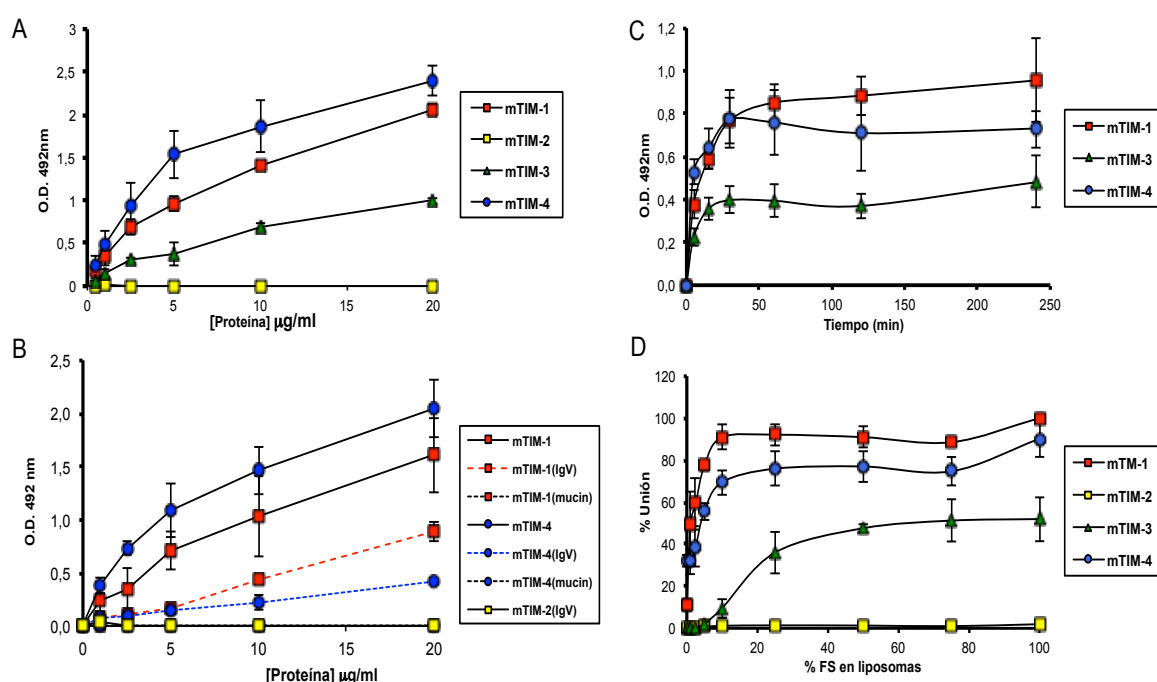


Figura 4.14. Unión de las proteínas TIM-Fc murinas a FS en liposomas. **A.** Unión a FS dependiente de la concentración de proteína soluble. La unión fue monitorizada mediante la medida de la absorbancia a 492nm (Ver *Materiales y métodos*). **B.** Unión a FS dependiente del dominio de la proteína TIM. Unión a liposomas de FS con proteínas TIM-Fc que contenían toda la parte extracelular, el dominio IgV o el dominio mucina, analizadas para diferentes concentraciones de proteína. **C.** Cinética de unión de las proteínas TIM-Fc solubles a FS. La concentración de proteínas usada fue de 5 µg/ml. **D.** Unión de las proteínas TIM-Fc solubles a liposomas con diferente contenido de FS. El porcentaje de FS en liposomas preparados con FS y FC se muestra en el eje de abscisas. En todos los experimentos se restó la unión inespecífica de las proteínas TIM-Fc a liposomas con una composición de un 100% de FC. Se muestra la media y la desviación estándar correspondiente a 3 experimentos.

Para analizar la implicación individual del dominio IgV y del dominio mucina en la unión a FS en liposomas, realizamos ensayos unión con proteínas que contenían exclusivamente los dominios IgV (TIM(IgV)) o con los dominios mucina (TIM(mucin)) de las proteínas TIM (Fig. 4.14B). De esta manera mostramos que el dominio IgV de las proteínas TIM es el responsable de la unión a FS, mientras que el dominio mucina no contribuye en el reconocimiento de FS en proteínas solubles. Sin embargo, la unión detectada con los dominios IgV de las proteínas TIM fue menor que la detectada con la proteína que contiene la región extracelular completa, lo que puede deberse a una mejor presentación del dominio IgV, que permite una interacción bivalente de la molécula de FS en liposomas.

A continuación, realizamos ensayos de unión a FS a diferentes tiempos de incubación de las proteínas TIM con liposomas de FS. Para ello, incubamos las proteínas TIM a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ con los liposomas de FS o FC a tiempos crecientes, desde 5 minutos hasta 4 horas. Observamos que la cinética de unión a liposomas de FS que presentan mTIM-1, mTIM-3 y mTIM-4 es rápida, alcanzándose el máximo de unión a un tiempo de aproximadamente 45 minutos (Fig. 4.14B). Aunque la afinidad de mTIM-3 por FS es menor que la de mTIM-1 y mTIM-4, presenta una cinética de unión a FS similar. Así mismo estudiamos la unión de las proteínas TIM murinas a liposomas con diferente composición de FS, preparados con una mezcla de FS y FC. En estos experimentos observamos que la unión de mTIM-1 y mTIM-4 se saturaba con liposomas compuestos por un 10% de FS y un 90% de FC, mientras que mTIM-3 necesitó una mayor cantidad de FS en los liposomas para alcanzar el máximo de unión (Fig. 4.14C). La unión de mTIM-3 a FS se saturó con liposomas compuestos por un 20% de FS y un 80% de FC.

4.4.2. Ensayos de competición de la unión de las proteínas TIM a FS.

Para demostrar la especificidad de la unión de las proteínas TIM murinas a FS observada en los ensayos de unión a liposomas, realizamos ensayos de competición de la unión con varios compuestos (Fig. 4.15). En primer lugar utilizamos tartrato para competir en la unión de mTIM-1 y mTIM-4 a FS en liposomas. El tartrato aparecía unido al MILIBS de mTIM-4 en la forma cristalina mTIM-4/X2. Cuando incubamos las proteínas TIM con concentraciones crecientes de tartrato, observamos un efecto inhibitorio de la unión a FS. El IC_{50} o la mitad de la concentración máxima inhibitoria para el tartrato fue de 125 mM (Fig. 4.15). El efecto inhibitorio fue más drástico con EDTA, que presentó un

IC₅₀ de 12 mM, posiblemente debido a la quelación de cationes divalentes necesarios para una unión a FS. También utilizamos el compuesto DCFS para competir la unión de las proteínas TIM a FS en liposomas. El DCFS es una FS con cadenas alifáticas cortas, de seis átomos de carbono, lo que le confieren una mayor solubilidad en medio acuoso. Este compuesto inhibió la unión, con una IC₅₀ de 4mM. El débil efecto inhibitorio que se obtuvo con cloruro sódico, con un IC₅₀ de 500 mM, debe reflejar un efecto meramente electrostático (Fig. 4.15).

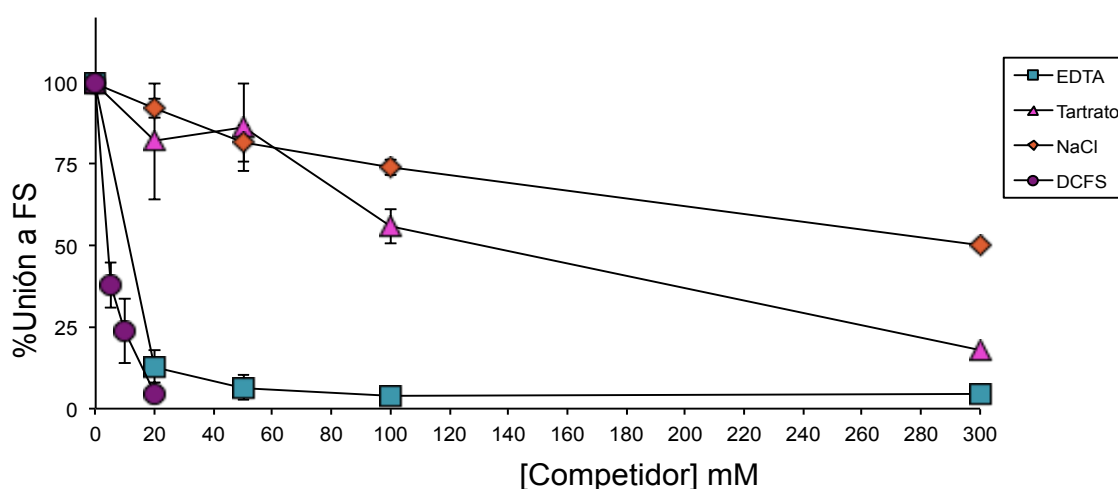


Figura 4.15: Competidores de la unión de mTIM-1 y mTIM-4 a liposomas de FS. Unión relativa de mTIM-1 y mTIM-4 a una concentración de 20 µg/ml a liposomas de FS es presencia de varios compuestos competidores en la unión de FS: DCFS, EDTA, Tartrato y NaCl. Se muestra la media y la desviación estándar correspondiente a tres experimentos.

4.4.3. Estructura cristalográfica de los dominios N-terminales de las proteínas mTIM-3 y mTIM-4 en complejo con fosfatidilserina.

4.4.3.1. Cristalización y determinación de la estructura de mTIM-4 con FS.

Para caracterizar el sitio de unión de FS en las proteínas TIM decidimos preparar cristales del dominio N-terminal de las proteínas TIM murinas con FS y determinar la estructura del complejo por cristalografía de rayos X. Procedimos a cristalizar los dominios IgV de mTIM-1 y mTIM-4 en complejo con FS. Para ello, se utilizaron proteínas TIM purificadas similares a las utilizadas en la cristalización de los dominio aislados, y DCFS. Las proteínas se incubaron con DCFS a 4°C durante toda la noche, antes de proceder a su cristalización con diferentes condiciones contenidas en kit comerciales. Se obtuvieron cristales con una mezcla de mTIM-4 y DCFS mediante el

método de gota sentada y con una solución de cristalización que contenía un 10% de Jefamina M600, 10 mM de Cl_3Fe y 0,1 M de citrato sódico pH 5,6. A esta nueva forma cristalina obtenida con mTIM-4 la llamamos forma cristalina X3 (mTIM-4 X3). No se obtuvieron cristales con mTIM-1.

Los cristales del complejo de mTIM-4 y DCFS pertenecían al grupo espacial P6_322 , contenían una molécula en la unidad asimétrica y un 64% de solvente (Fig. 4.16). Los cristales se incubaron durante un corto periodo de tiempo en una solución con la misma composición que la solución de cristalización con un 20% de glicerol como crioprotectante. Posteriormente se montaron en criolazos y se congelaron. Los cristales congelados, se transportaron a las líneas de radiación sincrotrón del ESRF para la colección de datos cristalográficos.

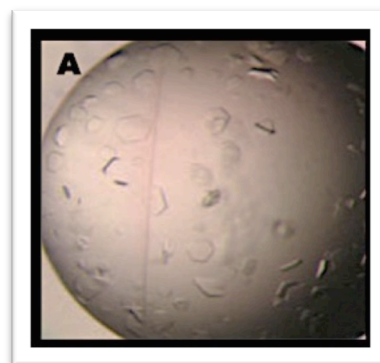


Figura 4.16. Cristales del dominio N-terminal de mTIM-4 en complejo con DCFS (mTIM-4 X3).

La determinación de la estructura del dominio N-terminal de mTIM-4 con FS se llevó a cabo mediante el método de reemplazo molecular usando la estructura de mTIM-4 sin ligando como modelo. Los modelos, se ajustaron manualmente a los mapas de densidad electrónica y se refinaron mediante el programa REFMAC (88). Todos los residuos se encuentran en regiones permitidas del mapa de Ramachandran. Los estadísticas correspondientes al procesamiento de datos cristalográficos y refinamiento de la estructura se muestran en la Tabla 4.2.

4.4.3.2. Estructura del dominio N-terminal de mTIM-4 en complejo con FS.

La estructura del dominio N-terminal de mTIM-4 en complejo con DCFS, que denominamos forma cristalográfica X3, es muy similar a las estructuras X1 y X2 de mTIM-4 sin FS (Fig. 4.17). La estructura mostró que la molécula de DCFS se unía al MILIBS descrito con la forma cristalográfica X2, donde también se unía una molécula de tartrato. En este caso, la molécula de DCFS presenta su cabeza hidrofílica en el interior de la cavidad formada por los lazos CC' y FG, con el grupo fosfato coordinado al ión metálico presente en el MILIBS y la serina interaccionando con la proteína (Fig. 4.18A). El ión metálico con el que se coordina el fosfato, está dispuesto de forma idéntica a la mostrada en la forma cristalográfica X2 (Fig. 4.10B), coordinado con los residuos Asn97 y Asp98 del lazo FG. La serina del DCFS se encuentra entre el ión metálico y el lazo CC', con su grupo amino interaccionando específicamente con un residuo de Asp y su grupo

carboxilato formando un puente de hidrogeno con el grupo hidroxilo de un residuo de Ser del lazo CC'. La región hidrofóbica del DCFS se encuentra interaccionando con los residuos aromáticos de Trp y Phe presentes en la parte superior del lazo FG (Fig. 4.18B).

Los residuos de coordinación con el metal y la conformación del lazo CC' están conservados en todas las proteínas de la familia TIM, excepto en mTIM-2. Así mismo, los residuos aromáticos de Trp y Phe en el lazo FG, encargados de estabilizar la zona hidrofóbica de la molécula de DCFS, están conservados en mTIM-1 y en las proteínas TIM-1 y TIM-4 humanas (Fig. 4.10C), por lo que la interacción de todas estas proteínas con FS será similar a la mostrada en la estructura de mTIM-4. Los residuos en la parte superior del lazo FG no están conservados en mTIM-3, aunque si lo están los residuos proteicos implicados en la coordinación del ión metálico (Fig. 4.10C).

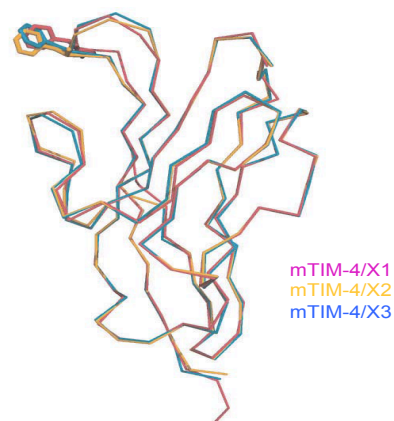


Figura 4.17: Superposición de las tres formas cristalográficas determinadas para el dominio N-terminal de mTIM-4. La forma cristalográfica X1 se muestra en rosa, X2 en amarillo y X3 en azul. Se muestra la disposición de la cadena lateral del residuo de Phe del lazo FG.

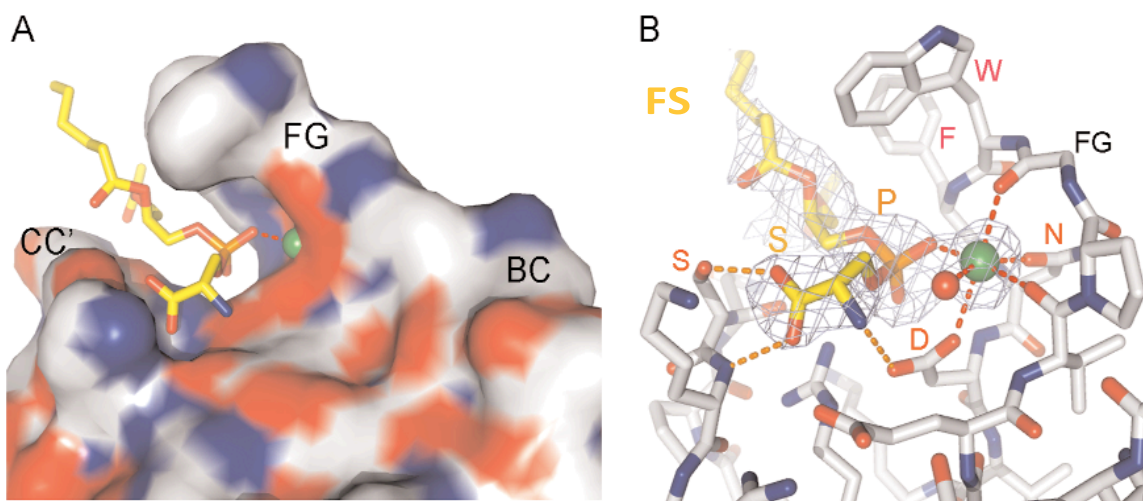


Figura 4.18: Estructura del dominio IgV de mTIM-4 en complejo con FS. **A.** Representación de la zona superior del dominio IgV de mTIM-4 en la forma cristalina X3. La molécula de DCFS está representada con los carbonos en amarillo, el grupo fosfato en naranja, los oxígenos en rojo y los nitrógenos en azul. El ión metálico se muestra como una esfera en verde y la coordinación como una línea discontinua roja. **B.** Visión detallada del MILIBS y de las interacciones que establece la molécula de DCFS con el ión metálico y los residuos proteicos. Se muestra el mapa de densidad Fo-Fc determinado en ausencia de ligando y de ión (malla azulada). Los enlaces de hidrogeno se representan como líneas discontinuas en naranja y las coordinaciones en rojo. Los residuos proteicos con los que se establece la interacción aparecen indicados.

4.4.3.3. Cristalización y determinación de la estructura del dominio N-terminal de mTIM-3 en complejo con fosfatidilserina.

La cristalización de mTIM-3 con FS se abordó de la misma manera que para mTIM-4. Se realizó una incubación previa de mTIM-3 con el compuesto DCFS y se procedió a su cristalización. Se realizaron pruebas de cristalización con condiciones contenidas en kit comerciales y se obtuvieron unos finos cristales en forma de placas hexagonales con una condición que contenía un 22% de PEG-4000, 0,1M de citrato sódico pH 5,6 y 50 mM de fluoruro sódico (Fig. 4.19A). No obstante, estos cristales presentaban cierta fragilidad relacionada con su tamaño, y aparecían adheridos a la placa de cristalización. Para prevenirlo, se crecieron los cristales sobre una gota de parafina. Esta técnica disminuye la velocidad de cristalización y la superficie de contacto de la gota de cristalización con la placa, de manera que favorece el orden de las moléculas en el cristal y disminuye la posibilidad de que los cristales crezcan pegados a la superficie de la placa. Con esta técnica, obtuvimos unos cristales hexagonales de mayor grosor que crecieron en la interfase existente entre la gota de parafina y la solución de cristalización (Fig. 4.19B). Estos cristales se congelaron tras ser incubados un corto periodo de tiempo en la condición de cristalización con la adición de 10% de glicerol, se montaron en criolazos y se transportaron congelados en nitrógeno líquido al ESRF, donde se procedió a la colección de los datos de difracción.

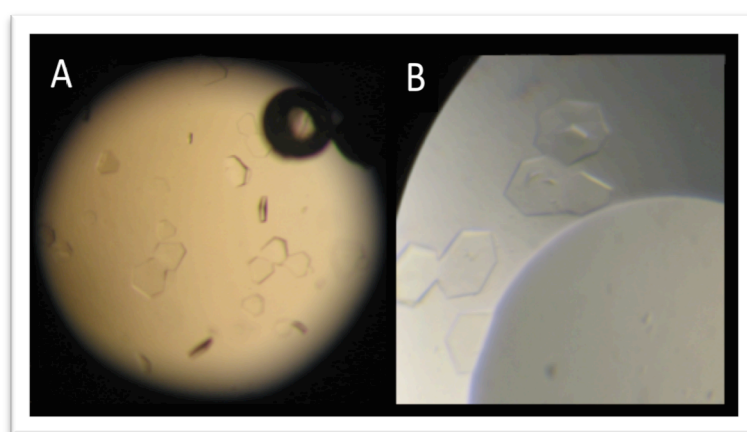


Figura 4.19. Cristales del dominio N-terminal de mTIM-3 en complejo con DCFS. A. Cristales de mTIM-3 con DCFS pegados a la superficie de la placa obtenidos con el método de gota sentada. B. Cristales de mTIM-3 con DCFS crecidos sobre parafina.

La determinación de la estructura de mTIM-3 con FS se realizó mediante el método de reemplazo molecular usando la estructura de mTIM-3 sin ligando como modelo (PDB ID 2OYP). La estructura fue refinada usando el programa Phenix.refine (147). Los

modelos fueron ajustados manualmente durante el proceso de refinado (Tabla 4.2). La ocupación del compuesto DCFS en la estructura no era muy alta, ya que los mapas de densidad electrónica sólo mostraron una molécula de DCFS unida al MILIBS en una de las dos moléculas de la unidad asimétrica del cristal. Las dos cadenas alifáticas de DCFS estaban muy poco definidas en los mapas de densidad electrónica y no se pudieron modelar durante el refinamiento. Todos los residuos de la estructura se encuentran en regiones permitidas del mapa de Ramachandran.

Tabla 4.2. Estadísticas de los datos cristalográficos y del refinamiento de las estructuras de mTIM-3 y mTIM-4 en complejo con FS. Ambas estructuras contienen dos moléculas de proteína en la unidad asimétrica (A y B). Las estadísticas para el rango más alto de resolución de los datos cristalográficos obtenidos con SCALA (18) se muestran en paréntesis.

	mTIM-4 X3	mTIM-3 FS
COLECCIÓN DE DATOS		
Grupo espacial	P6322	R32
Dimensiones celda		
a, b, c (Å)	66.3, 66.3, 139.4	71.9, 71.9, 263.6
α , β , γ (°)	90, 90, 120	90, 90, 120
Longitud de onda	0.9793	0.8726
Resolución (Å)	25-2.5	25-3.0
Rsym or Rmerge	5.7 (16.8)	9.4 (33.9)
I / σ I	9.3 (4.4)	6.0 (2.2)
Compleitud (%)	99.9 (100)	94.3 (90.7)
Redundancia	11.0 (10.2)	4.3 (3.8)
REFINAMIENTO		
Resolución (Å)	15-2.5	15-3.0
No. Reflexiones	6421	4946
Rwork / Rfree	21.9/24.8	23.5/24.5
No. átomos		
Proteína (A/B)	855	849/862
Ligando/iones	26/1	16/1
Agua	47	2
B-factors		
Proteína (A/B)	36	108/82
Ligando/iones	45/34	104/93
Agua	38	40
Desviaciones r.m.s.		
Bond lengths (Å)	0.008	0.003
Bond angles (°)	1.114	0.793

4.4.3.4. Estructura del dominio N-terminal de mTIM-3 en complejo con FS.

La estructura del dominio N-terminal de mTIM-3 en complejo con DCFS es muy similar a la de mTIM-3 sin ligando. La desviación media para los carbonos alfa entre ambas estructuras es de 1,05 Å (Fig. 4.20A), con algunas diferencias en los lazos de la parte superior del dominio. Así mismo, observamos pequeñas diferencias en los residuos del MILIBS, donde la molécula de DCFS se une (Fig. 4.20B, verde). En la estructura de mTIM-3 sin ligando, la cadena lateral del Trp38 del lazo CC' se encuentra cercana al lazo FG, de manera que ambos lazos aparecen conectados cerrando la cavidad (Fig. 4.20B, azul). Por el contrario, en la estructura de mTIM-3 con FS la cadena lateral del Trp38 se

encuentra alejada del lazo FG, permitiendo la unión de la FS al MILIBS. Existen también pequeños cambios conformacionales en los residuos Leu95 y Met96 de la zona superior del lazo FG, que posiblemente facilitan la unión de la molécula de DCFS. Consecuentemente, en la estructura del complejo la cavidad aparece abierta (Fig. 4.20B).

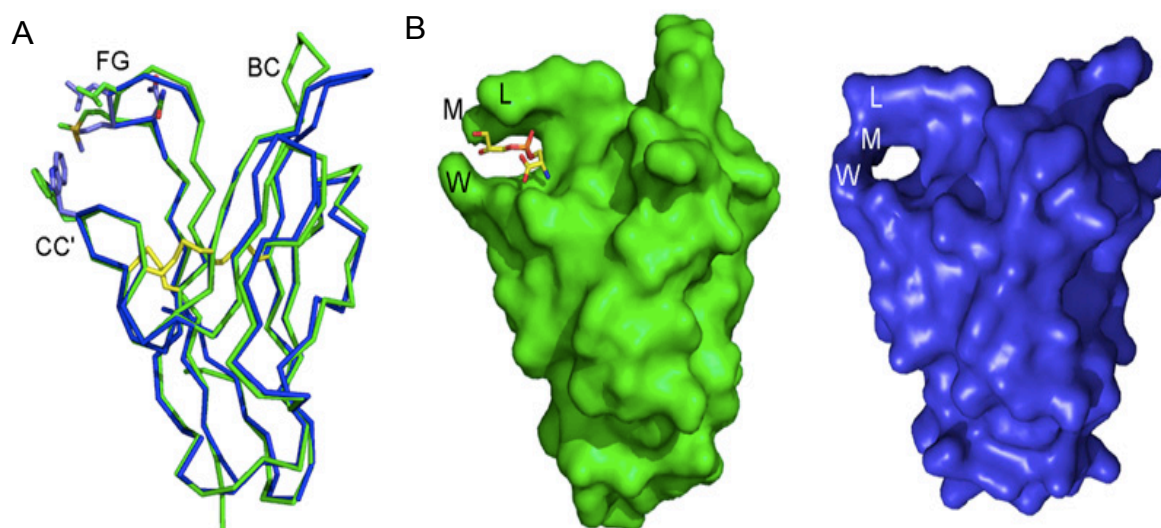


Figura 4.20. Estructura del dominio N-terminal de mTIM-3 en complejo con FS. **A.** Superposición de las estructuras de los dominios N-terminales de mTIM-3 (Azul) y mTIM-3 en complejo con DCFS (Verde). Los puentes disulfuro están representados como barras amarillas. Se muestran las cadenas laterales del residuo Trp38 en el lazo CC' y de los residuos de Leu y Met en el lazo FG de ambas estructuras. **B.** Representación de la superficie de los dominios N-terminales de mTIM-3 (azul) y mTIM-3 con DCFS (verde). La molécula de DCFS unida al MILIBS se muestra con una representación de barras, con los átomos de carbono en amarillo, el fósforo en naranja, los oxígenos en rojo y, los nitrógenos en azul. Los residuos Trp38 en el lazo CC' y de Leu y Met en el lazo FG aparecen señalados en ambas estructuras.

El modo en que la FS se une al MILIBS en la estructura de mTIM-3 es muy similar a la que anteriormente observamos con mTIM-4. Las cadenas laterales de los residuos Asn y Asp conservados, se coordinan con el ión metálico de igual manera a lo observado en la estructura de mTIM-4 con DCFS. La cabeza hidrofílica de la FS penetra en el MILIBS, mientras que las regiones hidrofóbicas se sitúan hacia el exterior de la cavidad (Fig. 4.21A y B). Encontramos ciertas diferencias en la interacción de la proteína con la región hidrofóbica de la DCFS. En el lazo FG, mTIM-4 usa dos residuos aromáticos, Trp94 y Phe95, para interaccionar con la región hidrofóbica del fosfolípido, mientras que mTIM-3 presenta una Leu y una Met. En la zona superior del lazo CC', donde mTIM-4 presenta un residuo polar de Asn, mTIM-3 tiene un residuo aromático, Trp38 (Fig. 4.21C). Por lo tanto, el dominio IgV de mTIM-3 también es capaz de unir una molécula de FS, aunque los residuos que interaccionan con la región apolar de la FS y que configuran las paredes

del MILIBS no están conservados, de forma que los contactos con esta región de la FS difieren en ambas proteínas.

Las estructuras han mostrado que el MILIBS parece estar diseñado para ser capaz de unir y acomodar en su interior exclusivamente el estereoisómero L de la molécula de FS, usado en la cristalización de los complejos. En el estereoisómero D, los grupos amino y carboxilato de la serina tendrían sus posiciones intercambiadas, de manera que el carboxilato se posicionaría cerca del residuo de Asp97 conservado, en un entorno electrostáticamente desfavorable.

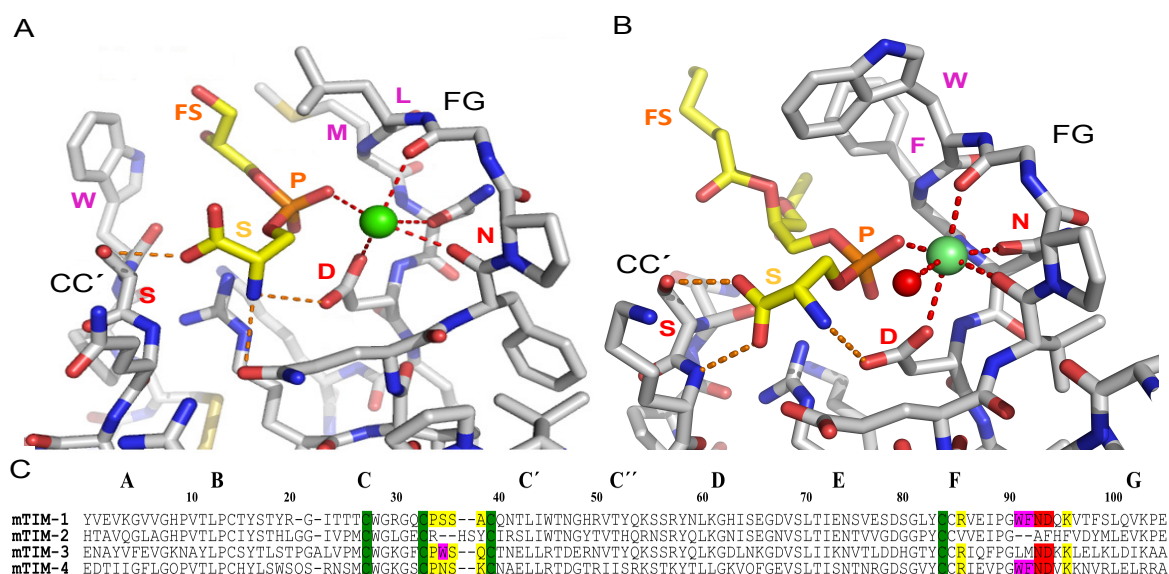


Figura 4.21. Unión de FS al MILIBS de mTIM-3 y mTIM-4. Estructura de la zona superior del dominio N-terminal de mTIM-3 (A) y mTIM-4 (B) en complejo con DCFS. Representación en modelo de barras del MILIBS con la molécula de DCFS unida y coordinada al ión metálico (esfera verde). Los residuos de los lazos CC' y FG que constituyen el MILIBS se muestran con los carbonos en gris, mientras que la molécula de DCFS se muestra con los carbonos en amarillo, el fosfato se muestra en naranja, los átomos de oxígeno aparecen en rojo y los de nitrógeno en azul. Los residuos del lazo FG que coordinan con el metal y los encargados de interactuar con la zona hidrofóbica de la molécula de DCFS aparecen señalados. Las coordinaciones del ión metálico se muestran con líneas discontinuas roja. Los enlaces de puentes de hidrógeno entre la molécula de DCFS y la proteína aparecen como líneas discontinuas naranjas. C. Alineamiento de las secuencias de los dominios N-terminales de las proteínas TIM murinas. Los cuatro residuos de cisteínas extra aparecen resaltados en verde, los que coordinan el metal en rojo y los que interactúan con la zona hidrofóbica de la molécula de DCFS en magenta. Los residuos de la zona central lazo CC' y los residuos básicos de lámina β GFC con los que interactúa se resaltan en amarillo.

4.4.4. Contribución de los residuos del dominio IgV de las proteínas TIM en el reconocimiento de FS.

4.4.4.1. Contribución de los residuos del lazo FG al reconocimiento de FS.

Para entender mejor el papel individual de los residuos del MILIBS en la interacción con FS, decidimos realizar mutantes puntuales en las proteínas mTIM-1, mTIM-3 y mTIM-4, y analizar su efecto en la unión a FS, tal y como se explica en *Materiales y Métodos*. La sustitución por Ala de los residuos Asp y Asn del lazo FG que coordinan el ión metálico disminuyó significativamente, un 85%, la unión de las proteínas TIM a FS (Fig. 4.22). Así mismo, mutamos los residuos que interaccionan con la zona hidrofóbica de la molécula de DCFS en las estructuras. Realizamos tanto mutantes dobles para los dos residuos aromáticos del lazo FG de mTIM-1 y mTIM-4 (WF/AA) como mutantes simples para dichos residuos (W/A y F/A). Los mutantes simples disminuyeron la unión a FS en un 70 %, mientras que la sustitución de ambos residuos por Ala afectó drásticamente la unión de las proteínas TIM a FS, lo que nos indica que los residuos aromáticos tienen un papel crucial en la estabilización de la interacción. La capacidad de unión de mTIM-3 a FS también se vio significativamente afectada por mutaciones de los residuos de Met95 y Leu96 (LM/AA) del lazo FG, aunque el efecto no fue tan drástico como en el caso del doble mutante (FW/AA) del mismo lazo en mTIM-1 y mTIM-4 (Fig. 4.22).

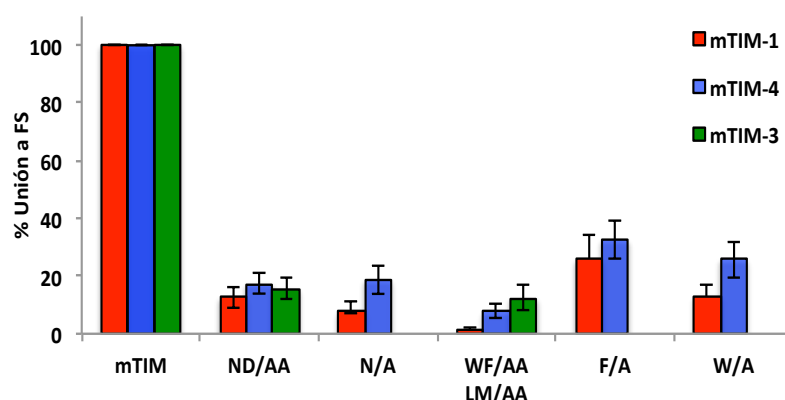


Figura 4.22. Unión de proteínas TIM mutantes del lazo FG a FS en liposomas. A. Porcentajes de unión de los mutantes respecto a las proteínas salvajes (mTIM). Unión de los mutantes de los residuos implicados en la coordinación del catión metálico (Asn y Asp) y los residuos de la zona superior del lazo FG implicados en la interacción con las cadenas alifáticas de FS (Trp y Phe o Leu y Met). Se muestran las medias y las desviaciones estándar de tres experimentos.

4.4.4.2. Contribución de los residuos del lazo CC' al reconocimiento de FS.

mTIM-3 no presenta residuos aromáticos en el lazo FG, como ocurre en mTIM-1 y mTIM-4, pero tiene un residuo de Trp en el lazo CC'. Nos pareció interesante estudiar el papel de este residuo, así como el de otros residuos del lazo CC' de mTIM-1 y mTIM-4. Para ello, realizamos mutantes puntuales de los residuos de Ser conservados en los lazos CC' de mTIM-1 (S37A) y mTIM-4 (S38A). Cuando realizamos los ensayos de unión a FS en liposomas con estos mutantes, observamos que la unión se veía disminuida aproximadamente un 20% en mTIM-1 y un 30 % en mTIM-4 (Fig. 4.23). Sin embargo, cuando sustituimos en mTIM-4 el residuo de Asn del lazo CC' por un Asp (N37D) sí observamos una disminución significativa, de un 70%, en la unión a FS (Fig. 4.23). La disminución en la unión observada confirma la implicación de los residuos del lazo CC' en la interacción con FS en liposomas, además de la importancia de la carga de estos residuos en esta interacción.

En el caso de mTIM-3, la sustitución de los residuos de Trp, Ser y Gln (WSQ) del lazo CC' de la proteína TIM-3 murina por los residuos de Val, Phe y Glu (VFE) de la humana (mutante hCC'), provocó una disminución significativa de aproximadamente un 70% en la unión a FS. No obstante, al eliminar el residuo aromático de Trp (W38A) presente en el lazo CC' de mTIM-3 observamos una disminución del 90% en la unión a FS. Esta drástica disminución en la unión confirma que el residuo hidrofóbico de Trp38 es clave para la interacción de mTIM-3 con FS.

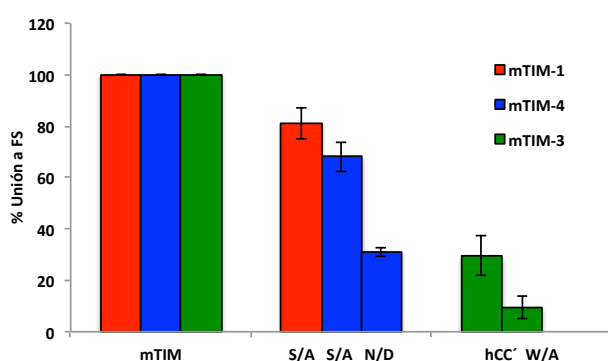


Figura 4.23. Unión de proteínas TIM mutantes del lazo CC' a FS en liposomas. Porcentaje de unión a FS de los mutantes respecto a las proteínas salvajes (mTIM). Unión a FS de mutantes de residuos del lazo CC' de mTIM-1 (rojo), mTIM-4 (azul) y mTIM-3 (verde). El mutante hCC' es una proteína mTIM-3 con el lazo CC' de la proteína humana. Se muestran las medias y las desviaciones estándar correspondientes a tres experimentos.

4.4.4.3. Contribución de los residuos del lazo BC al reconocimiento de FS.

El lazo BC se encuentra en la parte superior del dominio IgV de las proteínas TIM, adyacente al lazo FG, pero no forma parte del MILIBS ni interacciona con la FS (Fig.

4.20A). No obstante, es posible que este lazo pueda interaccionar con la membrana cuando la molécula de FS se une al MILIBS. Para determinar la contribución del lazo BC en la unión de las proteínas TIM a FS en liposomas, se mutaron los residuos de Arg presentes en los lazos BC de mTIM-1 (R22) y mTIM-4 (R25). Así mismo, diseñamos un mutante para mTIM-3 al que denominamos HBA2, donde sustituimos los residuos de Ser, Pro y Ala (SPA) del lazo BC de la variante BALB/c de mTIM-3 por los residuos de Pro, Ser y Thr (PST) de la variante HBA. En los ensayos de unión a FS en liposomas observamos que las mutaciones en los lazos BC de mTIM-1, mTIM-3 y mTIM-4, disminuían la unión de las proteínas aproximadamente un 60% (Fig. 4.24). Estos resultados indican que el lazo BC tiene un efecto modulador de la afinidad de las proteínas por FS, aunque no es esencial para el reconocimiento del fosfolípido, a diferencia de lo que se observó con mutantes de los lazos CC' y FG.

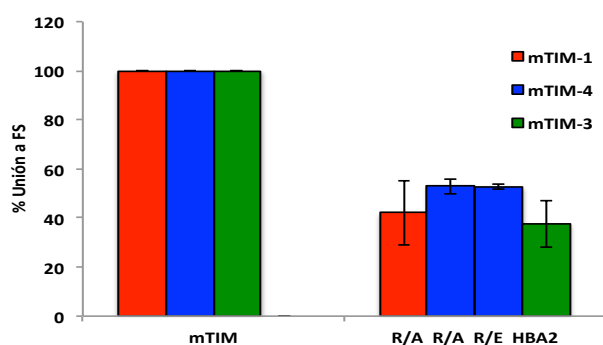


Figura 4.24. Unión de proteínas TIM mutantes del lazo BC a FS en liposomas. Porcentaje de unión a FS de los mutantes indicados respecto a las proteínas salvajes de mTIM-1 (rojo), mTIM-4 (azul) y mTIM-3 (verde). Se muestran las medias y las desviaciones estándar de tres experimentos

4.5. Variantes polimórficas de TIM-1 y TIM-3, papel de los polimorfismos en el reconocimiento de FS.

4.5.1. Interacción de las variantes polimórficas de mTIM-3 con FS.

Se han descrito dos variantes polimórficas para la proteína mTIM-3, la variante BALB/c y la variante HBA (91). Las diferencias entre ambas variantes consisten en 7 sustituciones de aminoácidos localizados en la hebra β A y en lazo BC del dominio IgV de mTIM-3 (Fig. 4.25A y C). Ensayos de unión a FS en liposomas mostraron que la variante HBA presentaba una unión un 50% menor que la variante BALB/c (Fig. 4.25B).

Debido a la importancia del lazo BC en la interacción con FS (Fig. 4.24), decidimos estudiar independientemente el efecto en la unión a FS tanto de las sustituciones en hebra β A como en lazo BC del dominio IgV. Para ello, realizamos dos mutantes de la variante

polimórfica BALB/c de mTIM-3, a las que denominamos HBA1 y HBA2. El mutante HBA1 presenta el dominio IgV de BALB/c con la hebra β A de HBA, mientras que el mutante HBA2 tiene el lazo BC de HBA (Fig. 4.25A y C). En los ensayos de unión a FS en liposomas observamos que el mutante HBA2 se unía de la misma manera que la variante HBA, mientras que el mutante HBA1 lo hacía como la variante BALB/c (Fig. 4.25B). Estos datos muestran que la disminución en la unión de la variante HBA respecto a la BALB/c se debe a los polimorfismos presentes en el lazo BC, incluidos en el mutante HBA2.

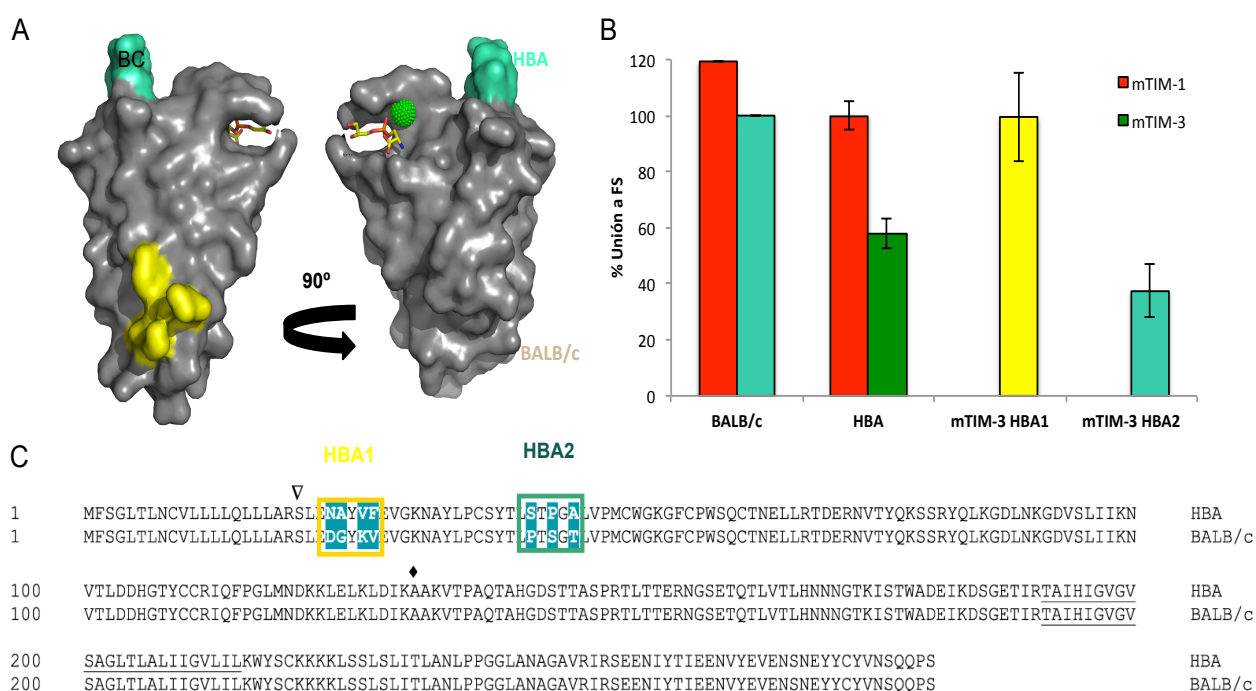


Figura 4.25. Variantes polimórficas de mTIM-3 y su interacción con FS en liposomas. **A.** Representación de la superficie del dominio IgV de mTIM-3 BALB/c. Las zonas del dominio que presentan los polimorfismos están representadas en amarillo (hebra β A) y en verde (lazo BC). **B.** Ensayo de unión a FS en liposomas de las variantes polimórficas HBA y BALB/c de mTIM-1 y mTIM-3, así como de los dos mutantes HBA1 y HBA2 de mTIM-3. Los datos corresponden a la media y la desviación estándar de tres experimentos. **C.** Alineamiento de las secuencias correspondientes a las dos variantes de mTIM-3. Los polimorfismos se señalan con un marco amarillo (hebra β A) o verde (lazo BC).

También realizamos ensayos de unión de las variantes polimórficas de mTIM-3 (HBA y BALB/c) a FS diluida en una mezcla de cloroformo metanol y evaporada directamente en la placa, tal y como se describe en *Materiales y métodos*. En estos ensayos la FS no se encuentra formando liposomas, sino que se presenta pegada al azar sobre la superficie de la placa. Cuando realizamos este tipo de unión, no se observaron diferencias en la unión a FS entre ambas variantes (Fig. 4.26). Estos resultados confirman la hipótesis de que el lazo BC no está directamente implicado en la interacción directa con FS, sino con la membrana circundante.

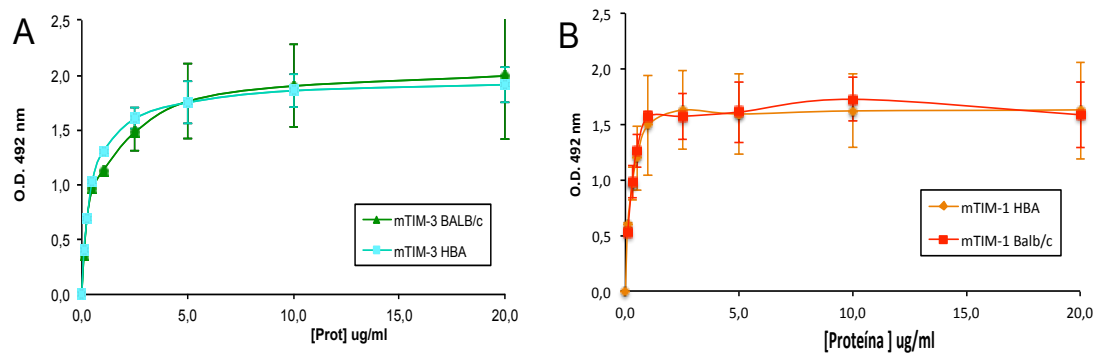


Figura 4.26. Unión de las variantes polimórficas HBA y BALB/c de mTIM-3 (A) y mTIM-1 (B) a FS sobre plástico. Representación de las densidades ópticas obtenidas en experimentos de unión de diferentes concentraciones de proteínas TIM-Fc a FS inmovilizada en plástico, realizados tal y como se describe en *Materiales y métodos*.

Los mutantes de mTIM-3 también se usaron para mapear los epítomos de anticuerpos monoclonales que reconocen el dominio IgV. El anticuerpo contra mTIM-3 8B.2C12 (Ebioscience) reconoce exclusivamente la variante BALB/c de mTIM-3, sin embargo, el anticuerpo contra mTIM-3 RMT3-23 (Ebioscience) es capaz de reconocer las dos variantes polimórficas de mTIM-3. Se analizó la unión de estos dos anticuerpos a las dos variantes polimórficas de mTIM-3 y a los mutantes realizados para las diferentes regiones del dominio IgV de la proteína. El anticuerpo 8B.2C12 se unió a la variante BALB/c, pero no la HBA o al mutante HBA2, indicando que su epítipo comprende el lazo BC localizado en la parte superior de dominio IgV (Fig. 4.27). Por el contrario, el anticuerpo RMT3-23 se unió a ambas variantes, pero no a mutantes de los lazos FG o CC', lo que nos indica que este anticuerpo reconoce el MILIBS de mTIM-3 (Fig. 4.27).

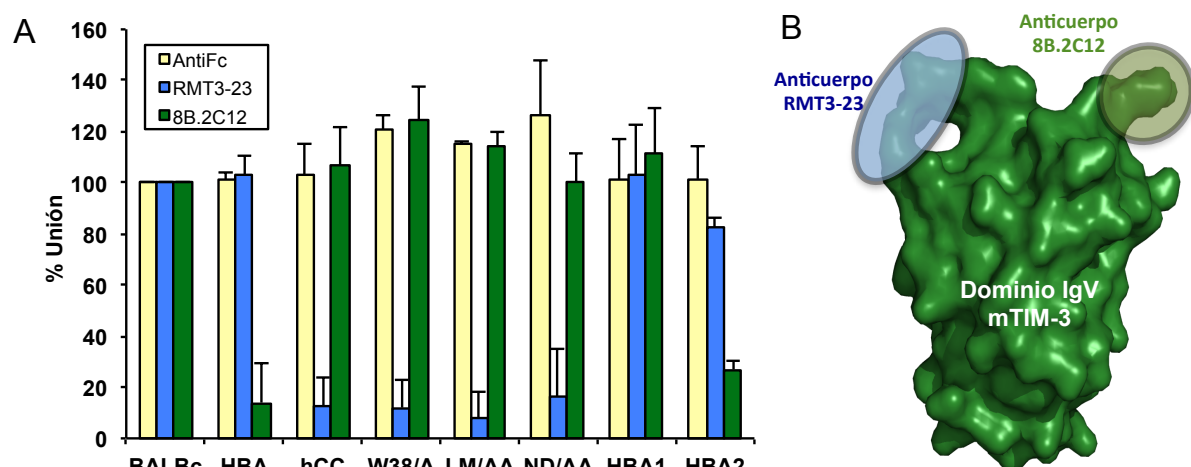


Figura 4.27. Epítomos de anticuerpos que reconocen el dominio IgV de mTIM-3. A. Unión de los anticuerpos comerciales RMT3-23 (barras azules) y 8B.2C12 (barras verdes) a la proteína mTIM-3 salvaje y mutantes normalizados por la unión a la variante BALB/c. La unión a un anticuerpo que reconoce la región Fc de las proteínas de fusión se incluye como control (barras amarillas). Los mutantes se han descrito en las Figuras 4.22 a 4.25. **B.** Representación de la superficie del dominio IgV de mTIM-3 y localización de los epítomos de los anticuerpos RMT3-23 en azul y 8B.2C12 en verde.

4.5.2. Interacción de las variantes polimórficas de TIM-1 con FS

TIM-1 humano y murino presentan dos variantes polimórficas, pero en este caso los polimorfismos se basan en inserciones/delecciones del dominio mucina, que no está implicado en el reconocimiento de FS. En humanos se han descrito dos variantes polimórficas que difieren en 6 aminoácidos (157insMTTTPV), mientras que en TIM-1 murino las variantes difieren en 15 residuos. Por ello, las variantes presentan diferencias en la longitud del dominio mucina, por lo que se han denominado como variante corta y larga en ambas proteínas (91).

Inicialmente analizamos la unión de las variantes de mTIM-1 a FS usando proteínas solubles mTIM-1-Fc. No se observó ninguna diferencia en la unión a FS entre ambas variantes solubles, tanto en experimentos de unión a FS en liposomas como en experimentos de unión a FS evaporada (Fig. 4.25B y 4.26B).

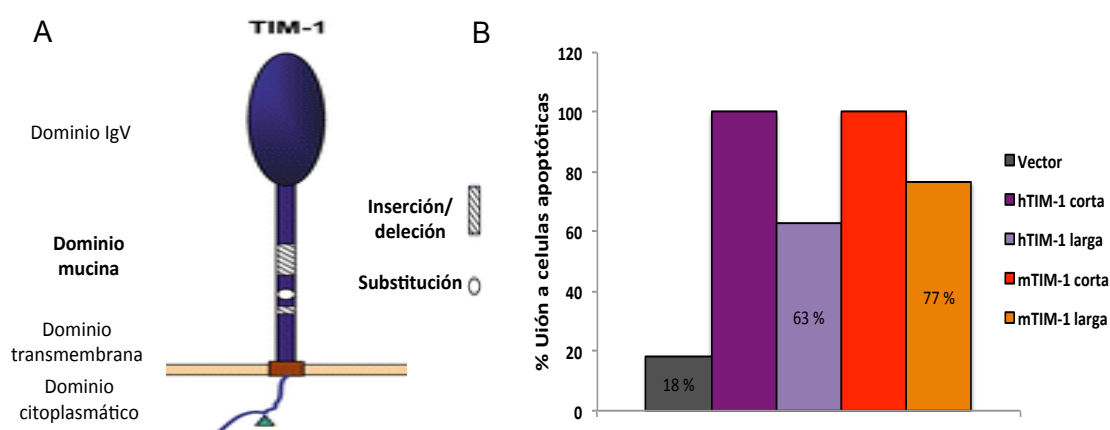


Figura 4.28. Interacción de las variantes polimórficas de TIM-1 humana y murina con FS en células apoptóticas. A. Polimorfismos en los dominios de mucina de las proteínas TIM-1 murina y humana. B. Unión de células apoptóticas a clones celulares que expresan las variantes TIM en la superficie celular. Porcentaje de unión referidos a las variantes TIM-1 cortas. Se comparan clones celulares que expresan similares cantidades de variantes TIM-1 cortas y largas en la superficie celular.

Durante mi estancia en el laboratorio del Dr. Gerardo Kaplan (FDA, Bethesda, USA) estudiamos la unión a células apoptóticas de las dos variantes (larga y corta) de la proteína TIM-1 humana y murina expresadas en la superficie celular. Transfectamos células con los DNAs correspondientes a las dos variantes de mTIM-1 y hTIM-1 y seleccionamos parejas de clones celulares con el mismo nivel de expresión para ambas variantes. Posteriormente realizamos experimentos de unión a células apoptóticas, tal y como se explica en *Materiales y métodos*. De este modo, observamos que las variantes de las

proteínas TIM-1 humana y murina con el dominio mucina más largo tienen una menor capacidad de unir células apoptóticas cuando se expresan en la superficie celular que las variantes cortas (Fig. 4.28). Por lo tanto, aunque el dominio mucina no medie directamente la interacción con FS, parece modular la interacción de las proteínas TIM con FS expuesta en la superficie de células apoptóticas. Esto puede ser debido a una diferente presentación del dominio N-terminal IgV al ligando.

4.6. Análisis biofísico de la interacción de las proteínas TIM con FS en membranas.

4.6.1. Variación de la tensión superficial de una monocapa de FS en presencia de las proteínas TIM.

La tensión superficial es una propiedad que presenta la superficie de un líquido, por la cual le permite ejercer una resistencia frente a una fuerza externa. Basándonos en el método de placa de Wilhelmy (164) y con ayuda de una microbalanza, podemos medir la tensión superficial ejercida por un líquido. Basándose en este método, Langmuir ideó una balanza donde al colocar una fina monocapa de lípido en la interfase líquido-aire, se podía medir el aumento de la tensión superficial en dicha monocapa al insertarse una macromolécula (20, 117, 118, 169). Decidimos utilizar la balanza de Langmuir para determinar el modo en que las proteínas TIM interaccionan con membranas que contienen FS, así como el efecto que provocan en éstas.

En primer lugar estimamos la adsorción interfacial de las proteínas TIM. La adsorción interfacial se calculó mediante la variación de la presión superficial ejercida por las proteínas en ausencia de monocapa lipídica. Para ello, se utilizó una microbalanza de Langmuir de superficie constante (130). Se usaron los dominios N-terminales producidos por replegamiento *in vitro* y usados para el trabajo estructural de las proteínas mTIM-2 y mTIM-4, así como los mutantes del lazo FG mTIM-4 ND/AA y mTIM-4 FW/AA. Realizamos diluciones de las proteínas en tampón de unión (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl y 2,5 mM de CaCl_2) a varias concentraciones de proteína, entre 0,02 μM y 1 μM . La presión superficial ejercida por la proteína mTIM-4 y el mutante mTIM-4 ND/AA en una interfase líquido-aire fue similar, de aproximadamente 13 mN/m. Sin embargo, para el mutante mTIM-4 FW/AA el valor de presión superficial ejercida en una interfase aire-líquido fue menor, de unos 8 mN/m. Con todas las proteínas alcanzamos saturación a

una concentración de 0,15 μM . El hecho de que el mutante mTIM-4 FW/AA ejerza una menor tensión superficial en la interfase liquido-aire que la proteína salvaje y el mutante mTIM-4 ND/AA, puede deberse a la menor hidrofobicidad de esta proteína, ya que tiene mutados dos residuos hidrofóbicos expuestos. El valor de la tensión superficial calculado para la proteína mTIM-2 fue de 17 mN/m. La cara BED del dominio IgV de mTIM-2 está implicada en dimerización, por lo que presumiblemente es más hidrófoba que en otras proteínas TIM.

A continuación realizamos experimentos de inserción en monocapas de FS o FC, para determinar la presión de inserción crítica en una monocapa de FS de las proteínas mTIM-2, mTIM-4 y los mutantes mTIM-4 ND/AA, y mTIM-4 FW/AA a una concentración de 0,2 μM . La presión de inserción crítica es la presión máxima de una monocapa a la cual una proteína es capaz de penetrar en ella. En una monocapa de FS, el valor de la presión de inserción crítica obtenido para mTIM-4 fue de 22 mN/m, mientras que los dos mutantes presentaron una presión crítica de inserción mayor, de 29 mN/m en el caso de mTIM-4 ND/AA y de 30 mN/m mTIM-4 FW/AA (Fig. 4.29A). Estos resultados indicaron que ambos mutantes son capaces de insertarse con mayor facilidad en una monocapa de FS que la proteína salvaje.

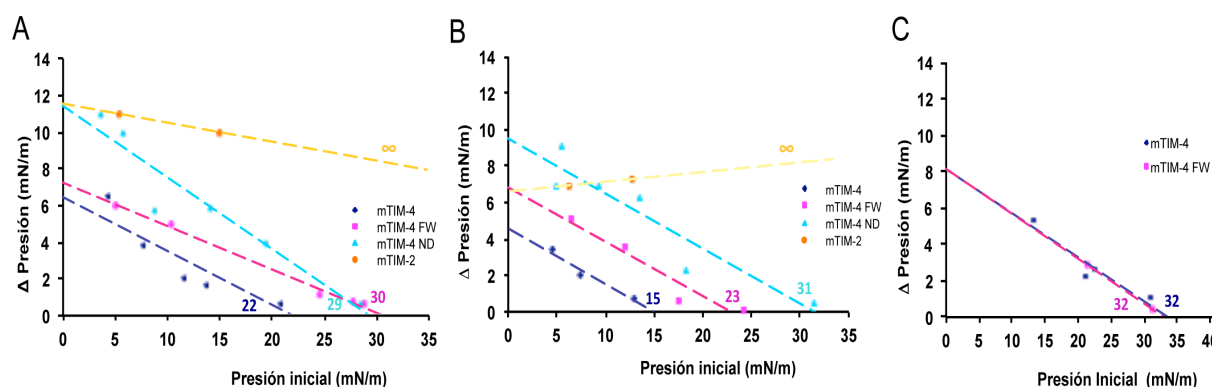


Figura 4.29. Incrementos de presión superficial en monocapas de FS (A) y FC (B) a diferentes presiones superficiales iniciales para las proteínas mTIM-4 (azul), mTIM-4 ND/AA (cian), mTIM-4 FW/AA (magenta) y mTIM-2 (amarillo). A. Incremento de la presión superficial obtenido en una monocapa de FS a diferentes presiones iniciales a una concentración de proteína de 0,2 μM . C. Incremento de la presión superficial obtenido en una monocapa de FS a diferentes presiones iniciales para mTIM-4 y mTIM-4 FW/AA en ausencia de calcio a una concentración de proteína de 0,2 μM . El valor de la presión de inserción crítica es el punto de corte con el eje X y se muestra para cada proteína en A, B y C, con el color correspondiente.

En experimentos de inserción a una monocapa de FC observamos una presión de inserción crítica menor que la obtenida en el caso de monocapas de FS para mTIM-4 y el mutante mTIM-4 FW/AA (15 mN/m y 23 mN/m), pero un valor similar para el mutante

mTIM-4 ND/AA (31 mN/m) (Fig. 4.29B). Estos resultados sugieren que tanto la proteína salvaje como el mutante mTIM-4 FW/AA son capaces de insertarse con mayor facilidad en monocapas de FS que de FC, mientras que el mutante mTIM-4 ND/AA no presenta especificidad de inserción. En experimentos de inserción a monocapas de FS o FC con la proteína mTIM-2, no observamos inserción a ninguno de los dos tipos de monocapas.

Ya que la interacción de las proteínas TIM murinas con FS es dependiente de calcio, decidimos realizar también experimentos de inserción con mTIM-4 y el mutante mTIM-4 FW/AA a monocapas de FS en ausencia de calcio. Para ello, diluimos ambas proteínas a una concentración final de 0,2 μ M en tampón de unión sin calcio y realizamos los experimentos de igual modo que en presencia de calcio. La presión de inserción crítica calculada para una monocapa de FS con las proteínas mTIM-4 y el mutante mTIM-4 FW/AA fue de 32 mN/m para ambas proteínas (Fig. 4.29C). Por lo tanto, en ausencia de calcio los valores de presión de inserción crítica obtenidos fueron mayores que los obtenidos en presencia de calcio, lo que indica que el calcio condiciona la capacidad de inserción de mTIM-4 en una membrana de FS.

4.6.2. Análisis espectroscópico de la interacción de las proteínas TIM con FS en liposomas.

Los dominios IgV de las proteínas TIM tienen un peso molecular de aproximadamente 16 kDa y contiene, dos o tres residuos de Trp y tres o seis residuos de Tyr (Fig. 4.30A). Según muestran las estructuras, el residuo de Trp del lazo FG de mTIM-1 y mTIM-4 o del lazo CC' en el caso de mTIM-3, están expuestos al solvente e interaccionan con FS en los complejos cristalográficos. Experimentos de mutagénesis han mostrado que estos residuos aromáticos son esenciales para la interacción de las proteínas TIM con FS en liposomas (Fig. 4.22). Durante esta interacción es de esperar que los residuos aromáticos experimenten un cambio en su entorno, ya que pasarán de estar expuestos al medio polar del solvente a un entorno relativamente hidrofóbico de la membrana. Estos cambios en el entorno del residuo de Trp deberían provocar una variación en los espectros de emisión de fluorescencia de las proteínas, relacionado con su interacción con membranas (171). Para determinar la posible penetración en membranas del residuo de Trp del MILIBS de las proteínas TIM durante su unión a FS, procedimos a determinar los espectros de fluorescencia de estas proteínas en presencia y ausencia de liposomas de FS y FC.

En primer lugar determinamos los espectros de fluorescencia intrínseca de los dominios N-terminales de las proteínas TIM en solución y en ausencia de FS (Fig. 4.30B). Las proteínas TIM presentaron unos máximos de fluorescencia intrínseca de 353 nm en el caso de mTIM-1, 340 nm en el caso de mTIM-2, 350 nm para mTIM-3 y 345 nm en el caso de mTIM-4 (Fig. 4.30C). mTIM-2 tiene el máximo de emisión de onda a una longitud de onda menor, lo que debe indicar que los residuos de Trp se encuentran menos expuestos en esta proteína.

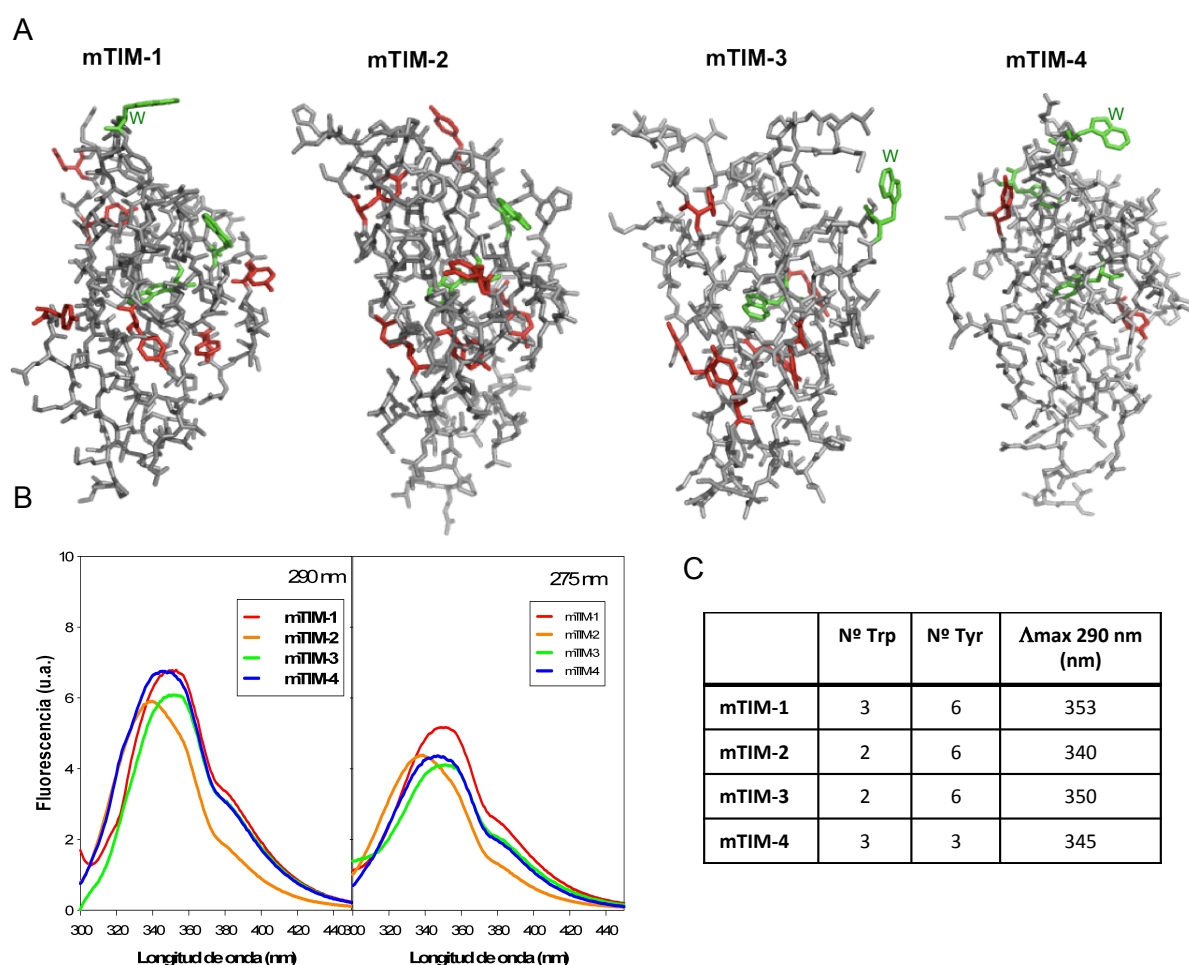


Figura 4.30. Emisión de fluorescencia intrínseca de las proteínas TIM murinas. **A.** Representación de las estructuras de los dominios IgV de las diferentes proteínas TIM murinas, con los residuos de Tyr en rojo y los Trp en verde. **B.** Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca a 290 nm y 275 nm de las proteínas mTIM-1 (rojo), mTIM-2 (naranja), mTIM-3 (verde) y mTIM-4 (azul). **C.** Tabla donde se muestran el número de residuos de Tyr y Trp, así como la longitud de onda de emisión máxima a 290 nm de las diferentes proteínas TIM murinas.

Una vez obtenidos los espectros de fluorescencia intrínseca de las proteínas TIM en solución, determinamos los espectros de fluorescencia de las proteínas TIM tras diferentes tiempos de incubación con liposomas de FS y FC. Al incubar las proteínas con liposomas

de FS, observamos una disminución de la intensidad de fluorescencia con el tiempo de aproximadamente un 20% en el caso de mTIM-1 y mTIM-4, y de un 15% en el caso de mTIM-3 (Fig. 4.31). Esta disminución no se observó con mTIM-2 al incubarla con liposomas de FS o FC. Por lo tanto, estos resultados indican cierta especificidad en la interacción de las proteínas mTIM-1, mTIM-3 y mTIM-4 con FS, ya que los residuos de Trp de estas proteínas sólo experimentaron un cambio de entorno cuando incubamos las proteínas mTIM-1, mTIM-3 y mTIM-4 con liposomas de FS.

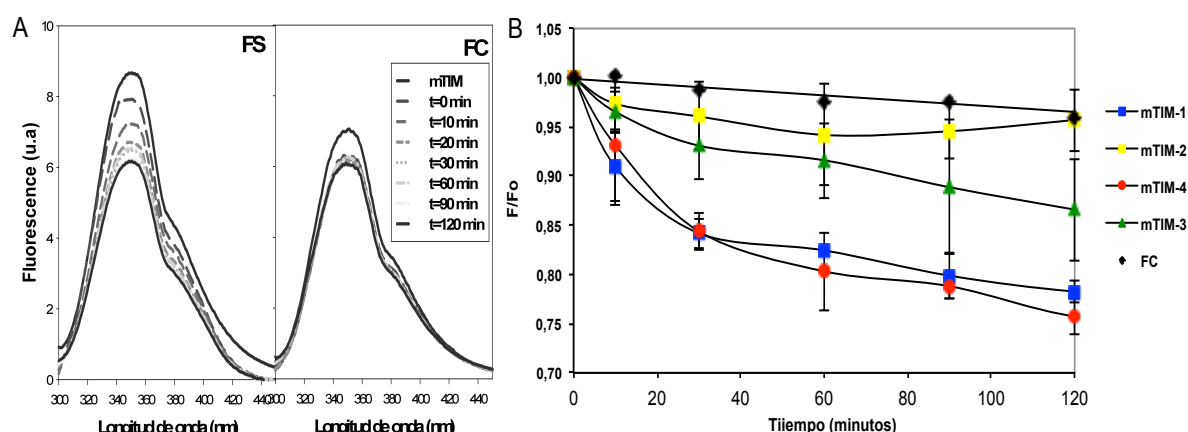


Figura 4.31. Variación de los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca con el tiempo de las proteínas TIM murinas en presencia de liposomas de FS y FC. A. Espectros de emisión de fluorescencia a 290 nm de las proteína mTIM-1 a 3 μ M a diferentes tiempos de incubación, desde 0 a 120 minutos, en presencia de 40 μ M liposomas de FS y FC. B. Cambio en la fluorescencia (F/F_0) en función del tiempo para las diferentes proteínas TIM murinas a 3 μ M en presencia de 40 μ M de liposomas de FS o FC. El cambio de fluorescencia relativa en presencia de liposomas de FC corresponde a la proteína mTIM-4.

A continuación estudiamos los espectros de fluorescencia de las proteínas TIM incubadas durante 60 minutos con concentraciones crecientes de liposomas de FS y FC (Fig. 4.32A). La asociación de las proteínas TIM con los liposomas de FS produjo una disminución de la intensidad de fluorescencia de magnitud similar a la observada anteriormente a diferentes tiempos de incubación cuando alcanzamos una relación molar 1:15 de proteína:lípido (Fig. 4.32B). Con mTIM-2 o al incubar las proteínas TIM con liposomas de FC, no se observó disminución en la intensidad de fluorescencia.

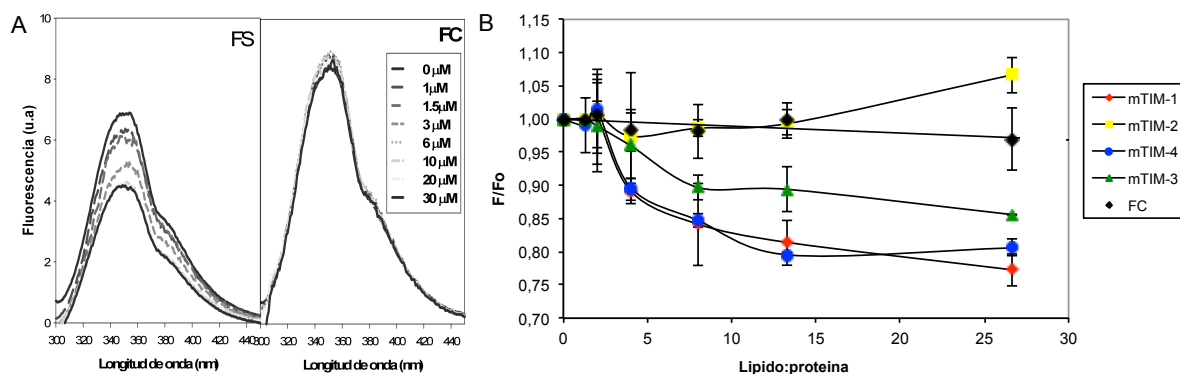


Figura 4.32. Variación de los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de las proteínas TIM murinas en presencia de concentraciones crecientes de liposomas de FS y FC. A. Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca a 290 nm de la proteína mTIM-1 a 3 μ M con concentraciones crecientes de liposomas de FS (izquierda) y FC (derecha). Espectros determinados sin liposomas (0 μ M) y tras 60 minutos de incubación con 1 μ M, 1.5 μ M, 3 μ M, 6 μ M, 12 μ M, 20 μ M y 30 μ M de liposomas. B. Cambio en la fluorescencia relativa en función de la relación lípido:proteína para las diferentes proteínas TIM murinas a 3 μ M tras 60 minutos de incubación con liposomas de FS y FC. El cambio de fluorescencia relativa en presencia de liposomas de FC mostrado corresponde a la proteína mTIM-4.

Tras los resultados obtenidos con las proteínas salvajes, decidimos usar esta técnica para estudiar los mutantes del MILIBS, mutantes de residuos que están directamente implicados en la interacción con FS. Para ello, determinamos los espectros de fluorescencia intrínseca a 290 nm de los mutantes de mTIM-4 sin los residuos hidrofóbicos del lazo FG (mTIM-4 FW/AA) o sin los residuos de coordinación con el metal (mTIM-4 ND/AA). Mientras que la proteína mTIM-4 salvaje y el mutante mTIM-4 ND/AA presentan un máximo de intensidad de fluorescencia intrínseca a 345 nm, el mutante mTIM-4 FW/AA presenta su máximo de emisión de onda desplazado a longitudes de onda menores de 339 nm, máximo típico de un Trp interno al dominio (Fig. 4.33). Al mutar el residuo de Trp expuesto al solvente en el lazo FG, la emisión de fluorescencia intrínseca de la proteína mutante está generada exclusivamente por los otros dos residuos de Trp no expuestos al solvente.

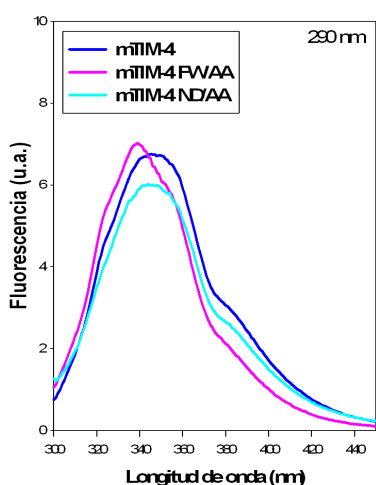


Figura 4.33. Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de mTIM-4 y los mutantes mTIM-4 ND/AA y FW/AA. Se muestran los espectros de emisión a 290 nm de fluorescencia intrínseca de las proteínas mTIM-4 (azul), el mutante de los residuos de coordinación del metal mTIM-4 ND/AA (cian) y el mutante que carece de los residuos hidrofóbicos de la zona superior del lazo FG mTIM-4 FW/A (magenta).

Los espectros de la proteína mTIM-4 salvaje y los mutantes en presencia de liposomas de FS, mostraron que la intensidad de fluorescencia de las dos proteínas mutantes no se ve disminuida de igual manera que la de la proteína salvaje. Mientras que la intensidad de fluorescencia de mTIM-4 disminuyó un 20% tras una hora de incubación con 10 μM de liposomas de FS, la fluorescencia del mutante de los residuos de coordinación con metal mTIM-4 ND/AA disminuyó un 10%, mientras que no se observó disminución con el mutante mTIM-4 FW/AA (Fig. 4.34A). Obtuvimos resultados similares al incubar las proteínas con concentraciones crecientes de liposomas de FS durante una hora. Mientras que con la proteína mTIM-4 sí observamos una disminución

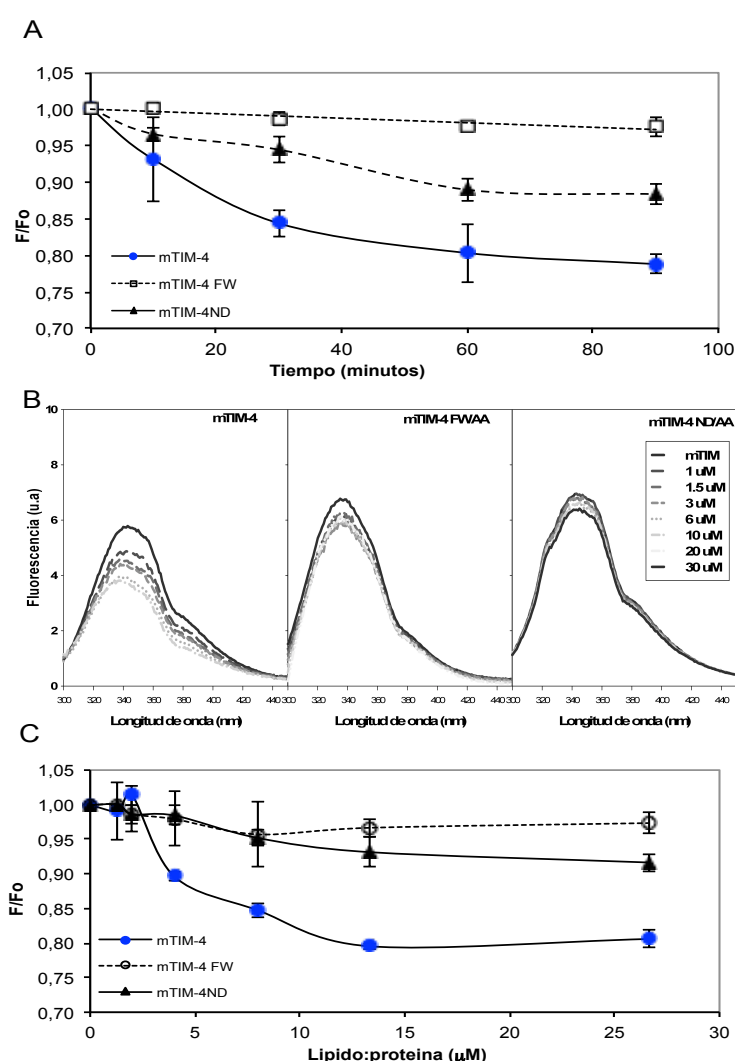
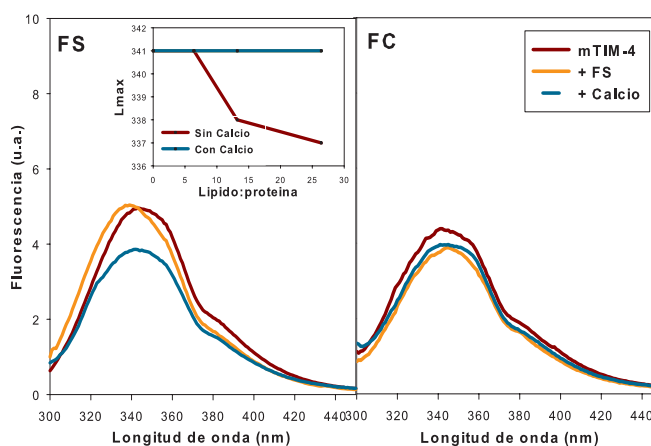


Figura 4.34. Variación de los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de mTIM-4 y los mutantes mTIM-4 ND/AA y FW/AA en presencia de liposomas de FS. **A.** Variación de la fluorescencia relativa en función del tiempo de mTIM-4 y los mutantes mTIM-4ND/AA y FW/AA a 3 μM en presencia de 40 μM de liposomas de FS. **B.** Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca a 290 nm de las proteínas mTIM-4 (izquierda), mTIM-4 FW/AA (centro) y mTIM-4 ND/AA (derecha) a 3 μM tras 60 minutos de incubación con concentraciones crecientes de liposomas de FS. **C.** Variación de la fluorescencia relativa de las proteínas a 3 μM en función de la relación lípido:Proteína tras 60 minutos de incubación con liposomas de FS.

de la intensidad de fluorescencia, no se observó disminución cuando realizamos el ensayo con los mutantes (Fig. 4.34B y C). Así mismo, al incubar la proteína salvaje y los mutantes con liposomas de FC a diferentes tiempos de incubación o a concentraciones crecientes de liposomas, no observamos disminución de la intensidad de fluorescencia (no mostrado).

Para estudiar el papel fundamental que desempeña el calcio en la interacción de las proteínas TIM con FS, determinamos los espectros de fluorescencia de mTIM-4 a 290 nm en ausencia de calcio. Los espectros de fluorescencia de mTIM-4 en presencia de liposomas de FS y en ausencia de calcio no mostraron una disminución de la intensidad de fluorescencia, sino un desplazamiento del máximo de emisión de onda hacia longitudes de onda menores (Fig. 4.35). El máximo de emisión se desplazó de 341 nm a 337 nm tras la adición de concentraciones crecientes de liposomas de FS. Una vez determinado el espectro de mTIM-4 con liposomas de FS en ausencia de calcio, se añadió calcio a la mezcla de incubación y se determinó un nuevo espectro. Tras la adición de calcio observamos una nueva variación en el espectro, la disminución de la intensidad de fluorescencia y el desplazamiento del máximo de longitud de onda hacia longitudes de onda mayores (Fig. 4.35A). No observamos este comportamiento cuando realizamos el mismo tipo de experimentos con liposomas de FC (Fig. 4.35B).

Figura 4.35. Efecto del calcio sobre los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de mTIM-4 en presencia de liposomas de FS (izquierda) o de FC (derecha). Espectros determinados en ausencia de calcio (rojo), tras la adición de 10 μ M de liposomas (naranja) y tras la adición de 2,5 mM de calcio (azul). En el recuadro interno se muestra la variación del máximo de longitud de emisión con la relación lípido/proteína, en ausencia (rojo) y presencia de 2,5 mM de calcio (azul).



4.7. Determinación de la afinidad de las proteínas TIM por FS en membranas.

Para determinar las cinéticas de unión y la afinidad de las proteínas TIM murinas por FS usamos la técnica de resonancia de plasmones de superficie (SPR) (11, 12, 19). Mediante el uso del instrumento BIAcoreTM 3000 y chips L1 (GE Healthcare) se pudo monitorizar la unión de los dominios IgV solubles de las proteínas mTIM a superficies con liposomas de FS y FC y determinar sus afinidades, tal y cómo se explica en *Materiales y métodos*.

Se realizaron varios tipos de experimentos donde se ensayaron superficies con diferentes cantidades y composición de liposomas inmovilizados en el chip. Inicialmente utilizamos superficies homogéneas que contenían exclusivamente liposomas de FS o de FC. Con estas superficies observamos unión específica de TIM-1 a FS y una unión marginal a FC (Fig. 4.36A). Por lo tanto, en todos los experimentos se utilizó una superficie de FC en la celda 1 del chip L1 como control. Así mismo, la cantidad de proteína unida dependió de la cantidad de FS inmovilizada en el chip (Fig. 4.36B). No se observó unión de la proteína a FS inmovilizada en ausencia de calcio (Fig. 4.36C), confirmando que la interacción en el BIAcore era dependiente de catión. Por este motivo, la regeneración de la superficie se realizó mediante la inyección de tampón Hepes con 25 mM de EDTA.

Tras observar una interacción específica entre el dominio N-terminal de las proteínas TIM con FS en el BIAcore, tal y como habíamos observado con proteínas TIM-Fc solubles y liposomas inmovilizados en placa, decidimos usar esta técnica para determinar la afinidad y las cinéticas para la interacción monomérica de las proteínas murinas de la familia TIM con FS. Utilizamos los dominios IgV de las proteínas nativas replegados *in vitro*, así como proteínas mTIM-4 mutantes que carecían de residuos implicados en la coordinación del metal (mTIM-4 ND/AA) o de los residuos hidrofóbicos de la zona superior del lazo FG (mTIM-4 FW/AA), residuos fundamentales para la unión de FS (Fig. 4.37). Inicialmente observamos que mTIM-1 y mTIM-4 se unían de manera similar a una superficie con FS, mientras que la unión de mTIM-3 era significativamente menor (Fig. 4.37). Tanto la asociación como la disociación de las proteínas al chip con FS eran relativamente rápidas. Por el contrario, mTIM-2 y el mutante mTIM-4 FW/AA no se unían a la superficie de FS, aunque sí observamos cierta unión del mutante mTIM-4 ND/AA (Fig. 4.37). No obstante, este mutante mostraba una disociación relativamente

lenta, comparada con la observada para las demás proteínas, lo que podría ser indicativo de agregación.

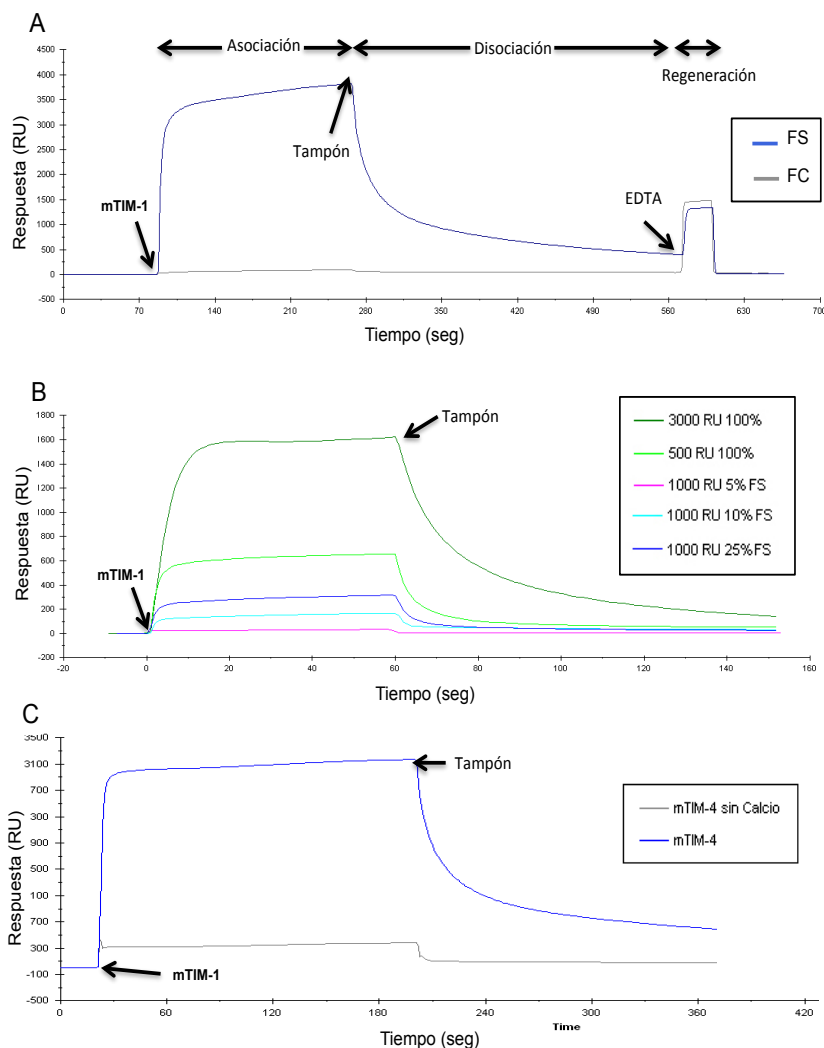


Figura 4.36. Interacción de las proteínas TIM murinas con liposomas de FS en el BIAcore. A. Unión de mTIM-1 (6 μ M) a superficies con liposomas de FS (azul) y de FC (gris) inmovilizados en un chip L1. Sensogramas monitorizados en tiempo real, que muestran la señal (Respuesta, RU) durante las fases de asociación y disociación de la proteína a las superficies y de regeneración de las mismas. Se indica el momento de inicio (TIM-1) y finalización (Tampón) de la inyección de la proteína. Los experimentos se realizaron con tampón Hepes-salino con 2,5 mM CaCl_2 y la regeneración con tampón Hepes-salino que contenía 25mM de EDTA. B. Sensogramas monitorizados durante la inyección de la proteína mTIM-1 (2 μ M) a través diferentes tipos de superficies de FS. La cantidad (RU) y composición de los liposomas inmovilizados en cada caso se muestra en la leyenda. C. Sensogramas obtenidos durante la inyección de mTIM-4 (4 μ M) a liposomas de FS en tampón Hepes-salino con 2,5 mM de CaCl_2 (azul) o sin calcio (gris).

Para la determinación de las cinéticas de unión de las proteínas TIM a FS en el BIAcore, realizamos experimentos en los que se inyectaron las proteínas a concentraciones de entre 200 y 6000 nM (Fig. 4.38). También se realizaron experimentos a diferentes flujos (10, 30 y 60 μ l/min) y con diferentes superficies, que diferían tanto en la composición como en la cantidad de FS inmovilizada (Fig. 4.36C).

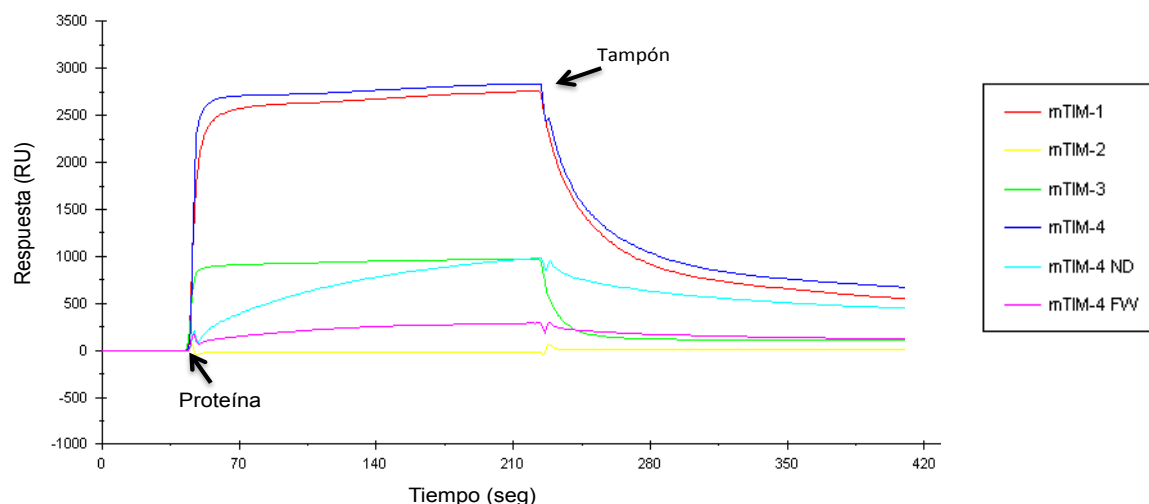


Figura 4.37. Interacción de las proteínas TIM murinas con FS en el BIAcore. Sensogramas monitorizados durante la asociación y disociación de las proteínas indicadas de una superficie con liposomas de FS inmovilizados.

El procesamiento de los datos y el ajuste de las curvas a los diferentes modelos de interacción se llevó a cabo con el programa Bievaluation v3.2 (66). El ajuste de los sensogramas a una interacción tipo 1:1 (Langmuir binding) fue mejor en los casos en los que se inmovilizó menor cantidad de liposomas o liposomas de composición mixta. La interacción a FS detectada a altas concentraciones de mTIM-1 (2 μ M, 4 μ M y 6 μ M) no ajustaba adecuadamente a un modelo de interacción tipo 1:1, por lo que estas curvas no fueron incluidas en los cálculos de las cinéticas de unión. Las curvas correspondientes a concentraciones elevadas de mTIM-1 no alcanzaban un estado estacionario como en el caso de mTIM-3 o mTIM-4. A altas concentraciones de mTIM-1 aparecía un segundo tipo de interacción, posiblemente debida a interacciones homofílicas TIM1-TIM1 o a problemas de agregación de la muestra.

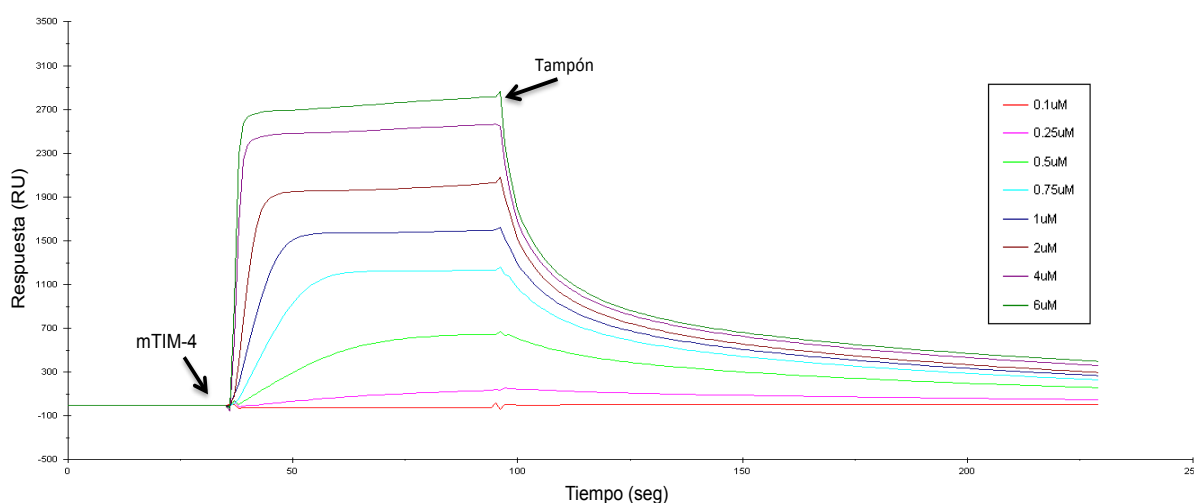


Figura 4.38. Interacción de las proteínas TIM con FS en el BIAcore. Se muestran sobrepuestos los sensogramas obtenidos durante la inyección de mTIM-4 a las concentraciones indicadas en la leyenda.

Los valores de las constantes cinéticas para la interacción monomérica de mTIM-1 y mTIM-4 con FS fueron muy similares, tal y como podíamos esperar de proteínas con un MILIBS tan similar. Ambas proteínas presentan constantes cinéticas de asociación y de disociación relativamente altas. Sus afinidades son del orden de 320 a 400 nM (Tabla 4.3), que podríamos calificar de moderadas. La menor afinidad determinada para mTIM-3, 1080 nM, es consistente con experimentos anteriores y viene determinada por una constante de asociación significativamente menor (Tabla 4.3). Por el contrario, su constante de disociación es de un rango similar al determinado para mTIM-1 y mTIM-4. Por lo tanto, mTIM-3 parece unirse con mayor dificultad a FS, posiblemente debido a una menor accesibilidad de su MILIBS.

Tabla 4.3. Afinidad y cinética de la interacción de las proteínas TIM con liposomas de FS. Afinidad y constantes cinéticas de asociación (kaso) y disociación (kdis) para la interacción de los dominios IgV de las proteínas TIM con FS determinadas en el BIAcore. Se muestra el valor medio y la desviación estándar correspondiente a 3 tipos diferentes de experimentos.

	kaso x10⁻⁵ (M⁻¹ s⁻¹)	kdis x10¹ (s⁻¹)	KD x10⁶ M
mTIM-1	2,8 ± 0,2	4,8 ± 0,8	0,32 ± 0,05
mTIM-2	--	--	--
mTIM-3	0,8 ± 0,2	9,8 ± 2,9	1,08 ± 0,07
mTIM-4	3,4 ± 0,2	5,3 ± 0,4	0,4 ± 0,01
mTIM-4 ND	0,7 ± 0,3	8,8 ± 3,5	1,42 ± 0,2
mTIM-4 FW	--	--	--

Para conocer los parámetros termodinámicos de la interacción de las proteínas TIM con FS realizamos los experimentos de unión a diferentes temperaturas en el BIAcore, con objeto de determinar la variación de las constantes cinéticas de asociación y disociación en función de la temperatura. Los experimentos se llevaron a cabo a dos flujos (10 µl/min y 30 µl/min) y a temperaturas de 15°C, 25°C, 30°C y 37°C. Cuando realizamos los experimentos de unión a diferentes temperaturas, observamos que la unión (RU) de las proteínas TIM a superficies con FS se veía disminuida a medida que aumentábamos la temperatura del proceso (Fig. 4.39A). El cálculo de las constantes cinéticas mostró una disminución de la constante de asociación y un aumento de la constante de disociación con la temperatura, que por lo tanto provoca una disminución de la afinidad de las proteínas TIM por FS (Fig. 4.39B).

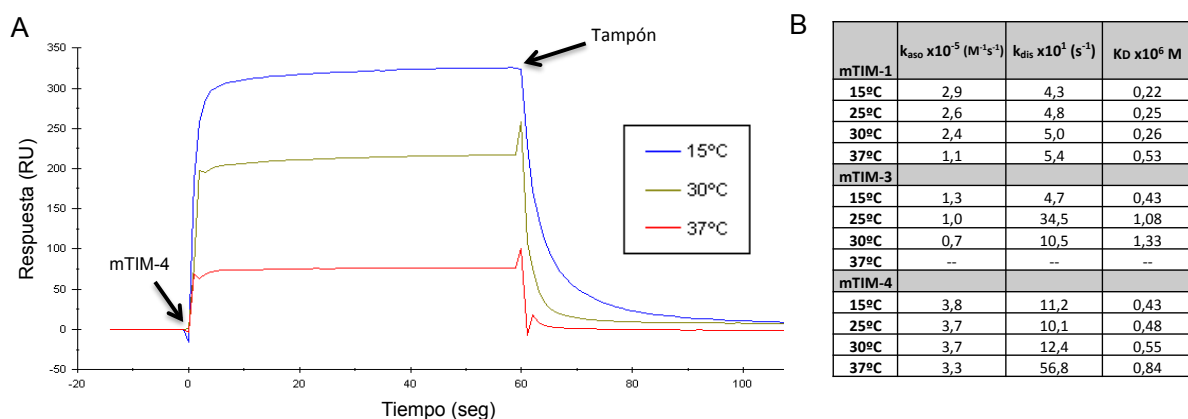


Figura 4.39. Efecto de la temperatura en la interacción de las proteínas TIM murinas con FS en el BIAcore. A. Sensogramas monitorizados durante la inyección de mTIM-4 (2uM) sobre una superficie con 500 unidades de liposomas de FS a 15°C (azul), 30°C (amarillo) y 37°C (rojo). **B.** Valores de las constante de asociación (kaso), disociación (kdis) y afinidad (KD) determinadas para las proteínas TIM a diferentes temperaturas.

Los valores de los parámetros termodinámicos para la reacción de unión de las proteínas TIM a FS fueron calculados tal y como se explica en *Materiales y métodos*. Los valores de energía libre de Gibbs (ΔG) obtenidos a 25°C para la unión de las proteínas mTIM-1, mTIM-3 y mTIM-4 a FS fueron negativos, indicando que la interacción de estas con la FS es un proceso favorable desde el punto de vista energético, y que por lo tanto, ocurre de manera espontánea. Los valores de entalpía (ΔH) calculados son negativos, por lo que la interacción es un proceso exotérmico, que desprende energía. Los valores de entropía (ΔS) obtenidos presentan un valor positivo lo que indica que el proceso genera desorden (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Parámetros termodinámicos para la interacción de las proteínas mTIM-1, mTIM-3 y mTIM-4 con FS obtenidos como se describe en *Materiales y métodos*. Se muestran los valores de energía libre de Gibbs (ΔG), entalpía (ΔH) y entropía (ΔS). Se muestra media y error de datos correspondientes a dos experimentos.

Proteína	mTIM-1	mTIM-3	mTIM-4
ΔG a 25°C (Kcal mol ⁻¹)	-8,7 ± 1,2	-8,0 ± 2,3	-8,7 ± 6,1
ΔH (Kcal mol ⁻¹)	-0,7 ± 0,5	-3,7 ± 1,0	-0,5 ± 0,1
$T\Delta S$ (Kcal mol ⁻¹)	7,9 ± 0,6	4,3 ± 1,8	8,2 ± 0,1

5. DISCUSIÓN:

5.1. Estructura del dominio N-terminal de las proteínas TIM murinas.

Las estructuras cristalográficas de los cuatro miembros murinos de la familia TIM han mostrado las características estructurales únicas de estas proteínas, aportando una información relevante para entender su función inmunológica. La expresión de los dominios N-terminales de las proteínas TIM murinas en un sistema bacteriano y su correcto repliegamiento *in vitro*, permitió la obtención de dichos dominios en cantidades suficientes para su cristalización. Las estructuras cristalográficas han mostrado que los dominios N-terminales de las proteínas TIM adoptan un plegamiento tipo IgV. Las cuatro cisteínas adicionales a las dos canónicas en los dominios IgV de las proteínas TIM generan un motivo estructural peculiar, constituido por un extenso lazo CC' replegado sobre la lámina β GFC y fijado a ésta por dos puentes disulfuro (Fig. 5.1). La conformación del lazo CC' es idéntica en mTIM-1, mTIM-3 y mTIM-4, mientras que en mTIM-2 la zona central del lazo adopta una conformación diferente y única. Esta conformación del lazo CC' de las proteínas TIM es distinta a la que se presenta en la mayoría de los dominios IgV homólogos, siendo similar al lazo observado en el dominio N-terminal del receptor CEA, a pesar de que éste carece de los puentes disulfuro (Fig. 4.11) (146). La conformación del lazo CC' de las proteínas TIM genera un lámina β GFC peculiar, distinta de aquellos dominios homólogos en otros receptores que utilizan esta

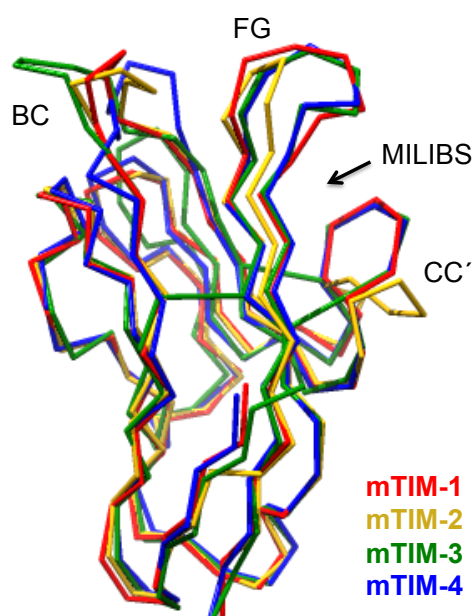


Figura 5.1. Superposición de las estructuras de los dominios N-terminales de las proteínas TIM murinas. Se muestra la estructura del dominio IgV de mTim-1 (rojo), mTIM-2 (amarillo), mTIM-3 (verde) y mTIM-4 (azul). El MILIBS y los lazos BC, FG y CC' en la parte superior de los dominios aparecen señalados.

cara del dominio IgV para el reconocimiento de ligandos (59, 155, 157). La peculiar conformación de la lámina β GFC en las proteínas TIM, sugiere que el modo en que estas proteínas reconocen ligandos en la membrana celular debe de diferir de otras proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF).

La estructura del dominio N-terminal de la proteína mTIM-4 reveló la existencia de un bolsillo molecular que contiene un sitio de coordinación de un ión metálico, motivo que las diferencia del resto de proteínas de la IgSF (128). Este bolsillo, al que denominados MILIBS, está formado por los lazos CC' y FG característicos de las proteínas TIM, y está conservado en todas las proteínas TIM excepto en mTIM-2. La ausencia de MILIBS en mTIM-2 es debida a la distinta conformación del lazo CC' que presenta esta proteína, y a la ausencia de los residuos del lazo FG implicados en la coordinación del catión (Fig. 4.12). Estos datos estructurales sugieren una divergencia en el reconocimiento de ligandos entre mTIM-2 y el resto de las proteínas TIM (129). La ausencia del ortólogo humano para mTIM-2, junto con las características especiales observadas en su dominio IgV, indican una divergencia evolutiva de esta proteína en ratones.

El MILIBS identificado en la estructura de mTIM-4 se encuentra altamente conservado en mTIM-1 tanto en conformación como en secuencia (Fig. 5.1). La secuencia del lazo FG es idéntica en ambas proteínas y los residuos del extremo del lazo CC' que construyen la parte inferior de la cavidad son muy similares. No obstante, al contrario de lo observado en las estructuras de mTIM-4, en la estructura de mTIM-1 la cavidad presentaba una conformación cerrada debido a la diferente disposición de la cadena lateral del residuo de Phe del lazo FG conservado en ambas proteínas. A pesar de no contar con estructuras de mTIM-1 en complejo con ligandos, los estudios funcionales indican que el MILIBS puede adoptar una conformación abierta en todas las proteínas apropiada para unión a ligandos, similar a la mostrada en mTIM-4 y diferente de la conformación cerrada mostrada por las estructuras de mTIM-1 y mTIM-3 en ausencia de ligandos.

Los residuos que constituyen el MILIBS de mTIM-3 difieren de mTIM-1 o mTIM-4 (Fig.4.10). Aunque mTIM-3 mantiene los dos residuos implicados en la coordinación de metal, carece de los residuos aromáticos de la parte superior del lazo FG, que en su caso se encuentran en el lazo CC'. No obstante, la conformación de los lazos CC' y FG, y de los residuos implicados en la coordinación del metal es muy similar en mTIM-1, mTIM-3 y mTIM-4, lo que indica que el MILIBS es un motivo conservado y característico de estas

proteínas, que posiblemente determina la especificidad por ciertos ligandos de las proteínas TIM.

5.2. Interacción de las proteínas TIM con FS.

Los resultados incluidos en esta Tesis muestran que las proteínas TIM-1, TIM-3 y TIM-4 son receptores de FS. Así mismo, hemos caracterizado la interacción de las proteínas TIM con FS en detalle, mediante la determinación de estructuras cristalográficas y de diversos análisis bioquímicos y biofísicos.

Las estructuras de las proteínas mTIM-3 y mTIM-4 en complejo con FS mostraron que la molécula de FS se unía al MILIBS característico de las proteínas TIM (26, 128), siendo el modo de reconocimiento muy similar en ambos casos (Fig. 4.21). La cabeza polar de la FS penetra en el bolsillo y determina la especificidad de la interacción. El fosfato de la FS se coordina a un ión calcio que también está coordinado con residuos del lazo FG de las proteínas, mientras que la serina contacta con residuos conservados en todas las proteínas TIM que unen FS. La disposición de la serina unida al fosfato en la L-FS es esencial para su interacción con residuos conservados del MILIBS, lo que explica la estereoselectividad de la unión (128). Adicionalmente, los residuos hidrofóbicos que constituyen las paredes del MILIBS contactan con la región apolar del fosfolípido.

Mediante ensayos de unión de las proteínas TIM a FS en liposomas hemos mostrado que todas las proteínas de la familia TIM son capaces de unirse a FS, excepto mTIM-2 (Fig. 4.14). También mostramos la contribución relevante de los residuos del MILIBS en el reconocimiento de FS, corroborando los datos estructurales. La mutación de los residuos implicados en la coordinación de metal (Asn y Asp) conservados en TIM-1, TIM-3 y TIM-4, demostró que estos residuos son esenciales para la unión específica de estas proteínas a FS en liposomas (Fig. 4.22). Así mismo, la eliminación de las cadenas laterales hidrofóbicas que constituyen las paredes del MILIBS y que contactan con la región apolar de la FS eliminó la interacción, indicando que los residuos hidrofóbicos contribuyen significativamente a la interacción (Fig. 4.22). Los estudios de mutagénesis no sólo han corroborado los datos estructurales, sino que también nos han ayudado a identificar nuevas regiones del dominio IgV de las proteínas TIM implicados en reconocimiento de FS en membranas. Mutaciones en el lazo BC, adyacente al lazo FG y localizado en la parte superior del dominio IgV, mostraron un efecto modulador de la interacción de las proteínas TIM con FS en liposomas (Fig. 4.24), que puede estar

relacionada con la interacción de esta región con la membrana, tal y como se discute más adelante.

La región apolar de la FS, compuesta por las cadenas de ácidos grasos y la molécula de glicerol, ancla el fosfolípido a la membrana celular. Esta zona de la FS interacciona con los residuos hidrofóbicos que forman las paredes de MILIBS. Todas las proteínas TIM que unen FS tienen al menos un residuo aromático implicado en la unión, ya sea en el lazo FG o en el lazo CC', o en ambos, como es el caso de las proteínas TIM-1 y TIM-4 humanas. Estos residuos contactan con la región apolar de la FS y son esenciales para la interacción. Tal y como han mostrado las estructuras de las proteínas TIM resueltas hasta la fecha, estos residuos aromáticos pueden adoptar diversas conformaciones, que posiblemente determinan la accesibilidad del MILIBS a ligandos. No obstante, la conformación desplegada de estos residuos observada en los complejos cristalográficos de las proteínas TIM con FS, sugieren que podrían penetrar en la membrana celular al interaccionar con FS, posibilidad que ha sido analizada por técnicas biofísicas durante el desarrollo de esta Tesis.

Los estudios de espectroscopía de fluorescencia han mostrado que el espectro de fluorescencia intrínseca de las proteínas TIM-1, TIM-3 y TIM-4 murinas experimenta una variación significativa en presencia de liposomas de FS. La disminución de la intensidad de fluorescencia en presencia de calcio y liposomas de FS indica un cambio del entorno de los residuos de Trp del MILIBS; éstos se encuentran relativamente expuestos al solvente y deben pasar a un entorno más hidrofóbico cuando las proteínas interaccionan con FS en membranas. En presencia de calcio, catión esencial para la unión específica de las proteínas TIM a FS, se observó una disminución del máximo del espectro de fluorescencia, cambio representativo de una inserción poco profunda del Trp en una membrana (30, 139, 171). Este resultado se ajusta a lo observado en los estudios cristalográficos, donde los residuos aromáticos del MILIBS interaccionan preferente con el glicerol de la FS. No obstante, en ausencia de calcio se observó un desplazamiento del máximo de los espectros hacia longitudes de onda menores, bien por la ausencia del apantallamiento de fluorescencia producido por el catión o por la disposición del residuo de Trp en un entorno más hidrofóbico (22, 30). Estos resultados sugieren una cierta tendencia de los residuos aromáticos del MILIBS a interaccionar con membranas, tal y como se ha observado con los péptidos de fusión de virus con envuelta (55), que se encuentran en lazos y contienen residuos aromáticos, similares a los lazos que constituyen el MILIBS. Es posible que en ausencia de calcio los residuos aromáticos del MILIBS penetren más profundamente en la

membrana y contacten con los ácidos grasos de los fosfolípidos. Esta hipótesis también se ajusta a los resultados obtenidos en experimentos de inserción en monocapas, donde mTIM-4 tiene una mayor capacidad de inserción en membranas de FS en ausencia de calcio (Fig. 4.29). Así pues, el ión de calcio puede determinar el modo de interacción de las proteínas TIM con membranas y su especificidad por FS.

En base a los resultados expuestos en esta Tesis, principalmente los trabajos cristalográficos, hemos elaborado un modelo para la interacción del dominio IgV de las proteínas TIM con FS, presentado en la Figura 5.6. Según este modelo, cuando la cabeza polar de la FS penetra en el MILIBS y se coordina con el ión de calcio, las paredes de la cavidad penetran en la membrana. Los residuos hidrofóbicos contactan preferentemente con el glicerol y la región polar de los ácidos grasos, mientras que los residuos polares del lazo CC' de TIM-1 y TIM-4 pueden también formar puentes de hidrógeno con las regiones más polares y superficiales de la membrana. En la disposición mostrada para el dominio IgV, el lazo BC adyacente al MILIBS, se sitúa próximo a la membrana, pudiendo interaccionar con ésta y modulando la afinidad de la interacción, tal y como han mostrado los experimentos de mutagénesis de residuos del lazo BC y los ensayos de unión a FS en liposomas.

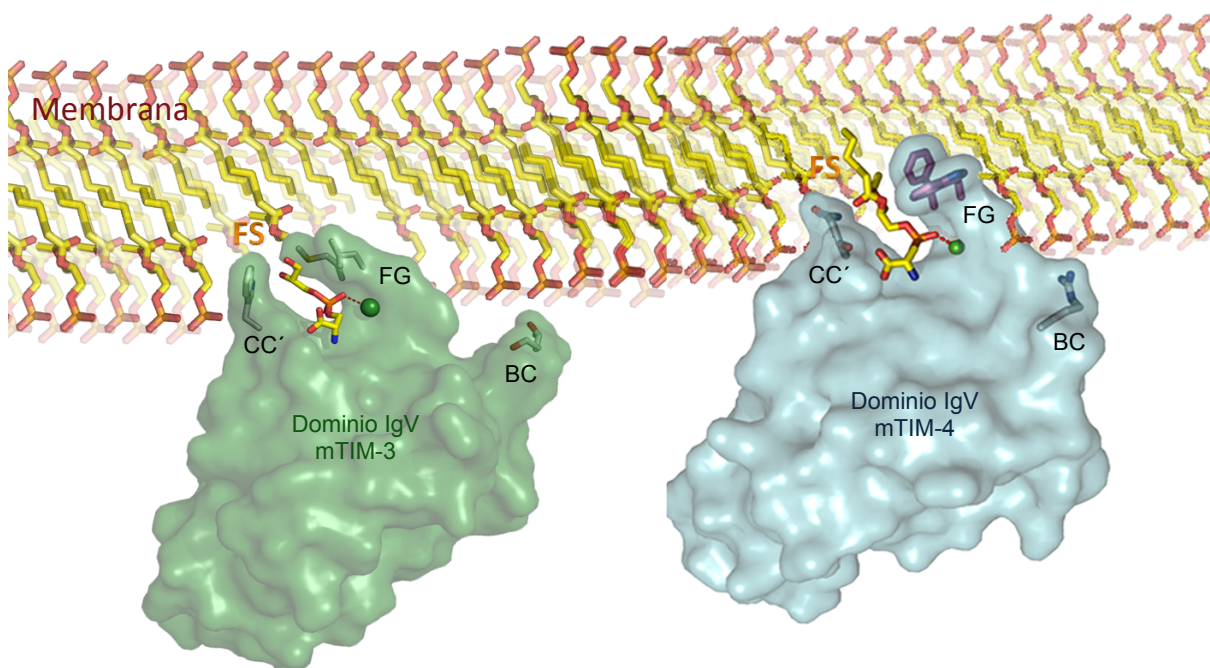


Figura 5.6. Modelo de interacción de las proteínas TIM con FS en membranas. Representación de la superficie del dominio IgV de la proteína mTIM-3 (verde) y mTIM-4 (azul) unida a una molécula de FS que se encuentra formando parte de una membrana. Se muestran las cadenas laterales de los residuos de la zona superior del lazo CC' (Trp en mTIM-3 y Asn y Ser en mTIM-4), de los residuos del lazo FG (Leu y Met en mTIM-3 y Trp y Phe en mTIM-4) y del lazo BC (Thr y Ser en mTIM-3 y Arg en mTIM-4).

El modelo de unión de las proteínas TIM a FS presentado es muy similar al descrito para el dominio tipo C2 de la PKC α (79, 156). Esta interacción es dependiente de calcio y estereoespecífica. Así mismo la PKC contiene residuos hidrofóbicos en los lazos que rodean la zona de interacción con la FS, que pueden establecer interacciones adicionales con la membrana celular. Además, tal y como describimos para el lazo BC en los TIM, se ha descrito que una región adyacente a aquella que interacciona con la FS, puede modular la afinidad de esta proteína por FS en membranas.

El uso del BIAcore nos ha permitido cuantificar la interacción de las proteínas TIM con FS en membranas. Estos experimentos presentaron una gran reproducibilidad, independiente del tipo de superficie y muestra proteica analizada. Así mismo, la dependencia de calcio de la interacción, nos ha permitido regenerar la superficie con EDTA y preservar la actividad de la misma durante un gran número de ciclos consecutivos de unión y regeneración. La interacción inespecífica de las proteínas con el chip L1, relativamente menor, ha sido corregida con una superficie control que contenía liposomas de FC. Por lo tanto, el uso de liposomas y un chip L1 nos ha permitido determinar la afinidad y las constantes cinéticas de interacción de proteínas TIM monoméricas con FS en liposomas. Así mismo, hemos realizado experimentos a varias temperaturas para la determinación de parámetros termodinámicos.

Las constantes de asociación calculadas para mTIM-1 y mTIM-4 ($\sim 3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), son similares e indicativas de una reacción de asociación rápida. No obstante, mTIM-3 presenta una constante de asociación unas 3 veces menor ($\sim 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), principal responsable de la menor afinidad de esta proteína por FS (Tabla 4.3. y Fig. 4.14). Las constantes de disociación para las tres proteínas son altas y similares (orden 10^{-1} s^{-1}), ligeramente mayor para mTIM-3 (Tabla 4.3), e indicativas de una interacción monomérica débil, similar a las descritas para interacciones intercelulares para moléculas de adhesión celular (154). Las moléculas de adhesión celular presentan una constante de afinidad moderada debida a una disociación muy rápida, lo que permite a estas moléculas mediar interacciones reversibles rápidas como las que realizan los linfocitos para el reconocimiento de otros tipos celulares. La afinidad calculada para la interacción de las proteínas TIM con FS ($\sim 300\text{-}1000 \text{ nM}$) es menor a la calculada para otras proteínas como la anexina V (5 nM), el factor de coagulación VIII (0,5 nM) o MFG-E8 (2 nM) (44, 121, 133). Así mismo, la afinidad calculada mediante ensayos de unión a FS en liposomas para la proteína dimérica TIM4-Fc fue de 2 nM (96). Sin embargo, esta afinidad no es comparable con los datos obtenidos mediante la técnica de BIAcore para las proteínas

TIM monoméricas. Por ello, sería interesante determinar la afinidad de las proteínas TIM diméricas en BIAcore.

Los valores termodinámicos de la interacción de las proteínas TIM con FS mostraron que la constante cinética de asociación disminuye con la temperatura y que por lo tanto la reacción es exotérmica (ΔH negativo), como la mayoría de las interacciones proteína:proteína estudiadas hasta la fecha. Esto indica que la interacción no requiere cambios conformacionales significativos en la proteína para la interacción con FS y que la interacción libera energía, posiblemente debida al cambio de entorno de los residuos hidrofóbicos del MILIBS, que puede ser invertida en cambios en la membrana. La entropía de la interacción de las proteínas TIM con FS en membranas es positiva, y puede ser indicativa de un aumento de desorden provocado por la interacción con la membrana.

5.3. Las proteínas TIM como receptores de FS.

Durante la búsqueda de ligandos para TIM-4 el grupo de investigación del Dr. G. J. Freeman observó que la proteína de fusión TIM4-Fc se unía con mayor avidez a células apoptóticas que a células en buen estado (Fig. 5.2A) (71). Estas observaciones constataron la relevancia biológica de la interacción de las proteínas de la familia TIM con FS. Es conocido que cuando una célula entra en apoptosis, la FS se expone en la cara externa de la membrana plasmática. Estudios posteriores del grupo del Dr. Freeman y los incluidos en esta Tesis mostraron inicialmente que TIM-4 reconocía FS, de forma que este ligando era responsable de la unión de la proteína a células apoptóticas. Seguidamente, mostramos que no sólo TIM-4 sino también TIM-1 y TIM-3 son capaces de unir de manera específica FS,

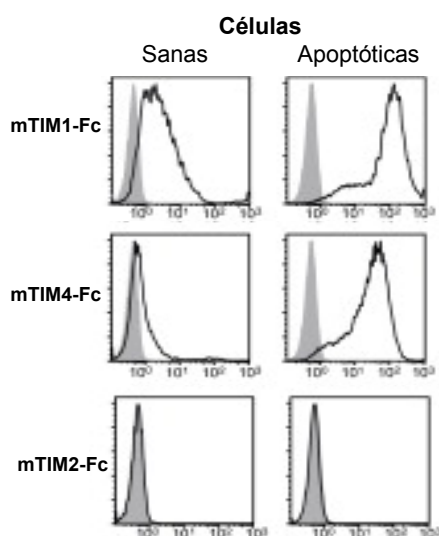


Figura 5.2. Unión de TIM-1 y TIM-4 a FS en la superficie de células apoptóticas. FACS análisis de la unión de las proteínas mTIM-1, mTIM-4 y mTIM-2 a células Jurkat sanas y apoptóticas.

indicando que el reconocimiento y eliminación de células apoptóticas podría ser una función biológica relevante de esta familia de proteínas (40).

Diversos trabajos confirmaron que células que expresan en su superficie TIM-1, TIM-3 y TIM-4 no sólo son capaces de unir células apoptóticas, sino que también son capaces de fagocitarlas (Fig. 5.3) (26, 71, 106). La capacidad de las proteínas TIM de reconocer y fagocitar células apoptóticas es inhibida por anticuerpos monoclonales contra las proteínas TIM y por liposomas de FS. El hecho de que los miembros de la familia TIM, TIM-1, TIM-3 y TIM-4, sean receptores celulares de FS, que se expresen en diferentes tipos celulares y en diferentes estados de activación o diferenciación celular, sugiere que estas proteínas dotarían al organismo de una alta versatilidad en el reconocimiento y la eliminación de células apoptóticas (26, 71, 106).

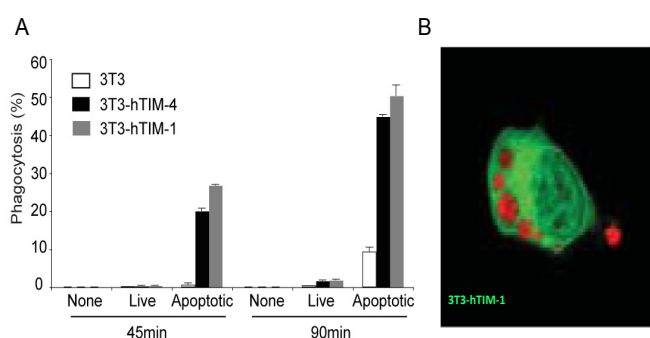


Figura 5.3. Células transfectadas con hTIM-1 y hTIM-4 son capaces de fagocitar células apoptóticas. **A.** Porcentaje de células sanas o apoptóticas fagocitadas por células NIH-3T3 sin transfectar (barras blancas), transfectadas con hTIM-1 (barras grises) o con hTIM-4 (barras negras). Se muestra la media y la desviación estándar correspondiente a tres experimentos. **B.** Imagen de microscopía confocal de una célula NIH-3T3 transfectada con hTIM-1 (verde) que ha fagocitado varias células apoptóticas (rojo).

5.3.1. TIM-4 como receptor de FS expuesta en células apoptóticas.

TIM-4 se expresa en macrófagos y células dendríticas del bazo, en los nódulos linfáticos, el timo y los testículos (131). Los macrófagos y las células dendríticas son células especializadas en la eliminación de las células apoptóticas y la presentación de antígenos asociados a muerte celular, por lo que la función de TIM-4 en la eliminación de células apoptóticas es más que evidente (95). Así mismo, el hecho de que la expresión de TIM-4 esté restringida a CPA profesionales sugiere una función específica en el reconocimiento de células apoptóticas y la regulación de la respuesta inmune (1). Experimentos con ratones que carecen de TIM-4 han mostrado un aumento de cuerpos apoptóticos *in vivo*. Así mismo, la administración *in vivo* de un anticuerpo contra TIM-4 bloqueó la fagocitosis de células apoptóticas mediada por macrófagos, y provocó el desarrollo de autoanticuerpos, corroborando la función relevante de esta proteína en la eliminación de células apoptóticas (96, 123).

La eliminación temprana de células apoptóticas por los fagocitos es un proceso clave en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica y la prevención de respuestas inflamatorias y autoinmunes (73). Deficiencias en este proceso podrían estar relacionadas con la asociación génica que presentan las proteínas TIM con el desarrollo de enfermedades autoinmunes y asma. Sin embargo, la manera en que TIM-4 es capaz de desencadenar la señalización intracelular que acompaña al proceso de fagocitosis es aún incierta, ya que el dominio citoplasmático de TIM-4 no presenta motivo de fosforilación tirosina quinasa al contrario que el resto de la familia de receptores TIM (110).

5.3.2. TIM-4 como receptor de FS en la superficie de exosomas.

El trabajo realizado por Nagata y colaboradores, donde también se describió la función de TIM-4 como receptor de FS y su papel en la eliminación de células apoptóticas, mostró la presencia de exosomas adyacentes a células transfectadas con TIM-4 mediante microscopía electrónica (96). En este entorno, las proteínas TIM podrían ser receptores de exosomas y activar rutas de señalización intracelular mediante el reconocimiento y la fagocitosis de estos. Así mismo, exosomas o cuerpos apoptóticos podrían actuar de puente entre dos células que expresan TIM-1 y TIM-4 (Fig. 5.4). TIM-1 se identificó como ligando de TIM-4 en experimentos de unión de proteínas TIM1-Fc a células que expresaban TIM-4 y viceversa (94). Sin embargo, estudios de BIAcore con las proteínas TIM purificadas mostraron que la interacción TIM1-TIM4 era de muy baja afinidad (6, 137). Estos resultados reafirman la idea de que los exosomas situados en las zonas intercelulares formen un puente entre dos proteínas TIM expresadas en células diferentes. Pero por el momento no tenemos datos que prueben la existencia de interacciones intercelulares mediadas por proteínas TIM y exosomas, tal y como se muestra en la Figura 5.4.

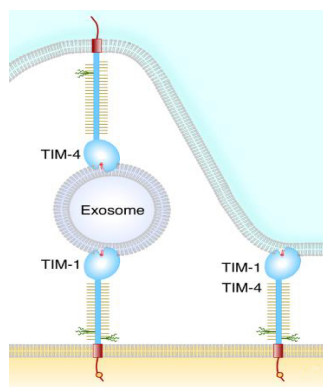


Figura 5.4. Modelo de la interacción de las proteínas TIM-1 y TIM-4 mediada por exosomas. TIM-1 y TIM-4 podrían interaccionar directamente con la FS expuesta en la superficie de células apoptóticas o activadas, o podrían estar reconociendo moléculas de FS presentes en la superficie de exosomas, por lo que estas vesículas podrían actuar de puente entre células que expresan proteínas TIM en su superficie.

5.3.3. TIM-1 como receptor de FS.

TIM-1 se expresa mayoritariamente en células T tipo Th2 o NK, células en las que desempeña una función coestimuladora de la activación y producción de citoquinas. Así mismo, la expresión de TIM-1 se induce en células epiteliales de riñón con daño renal agudo (56, 57). En este tejido, TIM-1 puede participar en el proceso de reparación de daño renal mediante la fagocitosis de células apoptóticas o necróticas generadas tras el daño isquémico (71). Sin embargo, TIM-1 expresada en las células T NK no media la eliminación de células apoptóticas, sino que actúa como un sensor de FS expuesta en células apoptóticas, provoca la activación de las células NK y desencadena una respuesta inflamatoria (78). Esta función es particularmente importante en tejidos donde están presentes células NK como el hígado y los pulmones. En los pulmones, el reconocimiento de las células apoptóticas mediante células NK conduce al desarrollo de AHR y a asma. En el hígado, la respuesta inmune provocada por la activación de células NK tras el reconocimiento de FS podría estar relacionada con la patogénesis de HAV (67).

Parece que dependiendo del tipo celular en el que se exprese, el reconocimiento de células apoptóticas por TIM-1 puede conducir a consecuencias biológicas diversas. Su expresión en ciertos tipos celulares conduce a la eliminación de células apoptóticas y a tolerancia inmunológica, mientras que TIM-1 expresada en otros tipos celulares, como células T NK, actúa como un sensor de FS expuesta en la superficie de células dañadas y puede conducir a la activación celular y a inflamación.

5.3.4. Las variantes polimórficas de TIM-1 en el reconocimiento de FS.

Los polimorfismos descritos en TIM-1 se han relacionado con la diferenciación Th1/Th2 y AHR en ratones BALB/c y HBA. La primera diferencia funcional observada entre las variantes polimórficas de TIM-1 humano, fue que la forma polimórfica larga de la proteína es capaz de reconocer más eficientemente HAV que la forma corta carente de la inserción 157MTTTPV (67). Este hecho da sentido a la relación existente entre la presencia de una inserción en el dominio mucina de TIM-1 humano y la menor predisposición a enfermedades atópicas observada en individuos expuestos a HAV (92). Además, las células NK que expresan la variante polimórfica larga de hTIM-1 presentan mayor citotoxicidad frente a células hepáticas infectadas por HAV que las que expresan la variante corta.

En este trabajo de Tesis hemos identificado otra diferencia funcional de las variantes polimórficas de TIM-1, tanto en la proteína humana como en la murina. Aunque la inserción que distingue ambas variantes se encuentra localizada en el dominio mucina, que no está implicado directamente en la interacción con FS, hemos observado que la variante larga de TIM-1 une FS más eficientemente que la variante corta (Fig. 4.28). Esta diferencia sólo es evidente cuando las proteínas se encuentran expresadas en la superficie de células transfectadas. Según estos resultados, parece que el dominio mucina condiciona la capacidad de unión a ligandos de TIM-1 humana y murina, quizá no mediante una implicación directa en la interacción, sino más bien modulando la accesibilidad de la zona de reconocimiento de ligandos o la organización de las proteínas TIM en la superficie celular. Esta diferencia en la unión a FS de las variantes polimórficas de TIM-1 humana y murina, quizá contribuya a las diferencias fenotípicas observadas entre los alelos (91). Aunque la relación entre la diferencia en el reconocimiento de células apoptóticas por las variantes polimórficas y la predisposición a asma, o en el desarrollo de una respuesta inmune Th1 o Th2, aún no se ha clarificado.

5.3.5. TIM-3 como receptor de FS.

La función de TIM-3 como receptor de FS y su importancia en la eliminación de células apoptóticas *in vivo* se ha publicado recientemente (26, 106). TIM-3 se expresa en células dendríticas CD8⁺ presentes en el bazo, macrófagos y monocitos, por lo que la identificación de TIM-3 como receptor de FS implicó a esta molécula en los procesos de eliminación de células apoptóticas (106). TIM-3 expresada en CPA es capaz de mediar la fagocitosis de células apoptóticas, mientras que TIM-3 expresada en CT es capaz de unir células apoptóticas pero no de fagocitarlas (26). Estos datos sugieren que las CT carecen de la maquinaria celular necesaria para la fagocitosis celular o que deben presentar en su superficie algún receptor que ejerza una señal "don't eat me" que inhiba dicho proceso (69). El entrecruzamiento de TIM-3 provocado por la unión a células apoptóticas desencadena una señal proapoptótica en la CT, similar a la provocada por la unión de galectina-9 a TIM-3 en células Th1 o Th17 (104, 172). Por lo tanto, la inducción de apoptosis en CT mediada por TIM-3 podría estar relacionada con la función inhibitoria de la respuesta inmune descrita para dicha proteína (106). La afinidad de la interacción de TIM-3 con células apoptóticas podría condicionar la capacidad de inducción de apoptosis y por lo tanto, la función inhibitoria de TIM-3 en el sistema inmune.

5.3.6. Las variantes polimórficas de TIM-3 en el reconocimiento de FS.

Durante este trabajo de Tesis hemos mostrado una diferencia funcional entre las dos variantes polimórficas HBA y BALB/c de mTIM-3, relacionada con la unión a FS (Fig. 4.25) (26). Además hemos determinado que los polimorfismos presentes en el lazo BC del dominio IgV de TIM-3 son los responsables de las diferencias de unión a FS entre las dos variantes de mTIM-3. En colaboración con el laboratorio del Dr. G. J. Freeman comprobamos que la variante HBA de mTIM-3 presentaba un 50% menos de unión a células apoptóticas que la variante BALB/c (Fig. 5.5A). Así mismo, ambas variantes polimórficas presentan una diferencia similar en la capacidad de fagocitar células apoptóticas (Fig. 5.5B). Así pues, las variantes polimórficas podrían diferir en su capacidad de inhibir la respuesta inmune tras la unión a células apoptóticas. Esta diferencia funcional entre los dos alelos puede estar relacionada con la diferencia en la respuesta inmunológica Th1/Th2 observada entre las variantes *in vivo* (91). Aunque los mecanismos moleculares responsables de estas diferencias se desconocen en la actualidad.

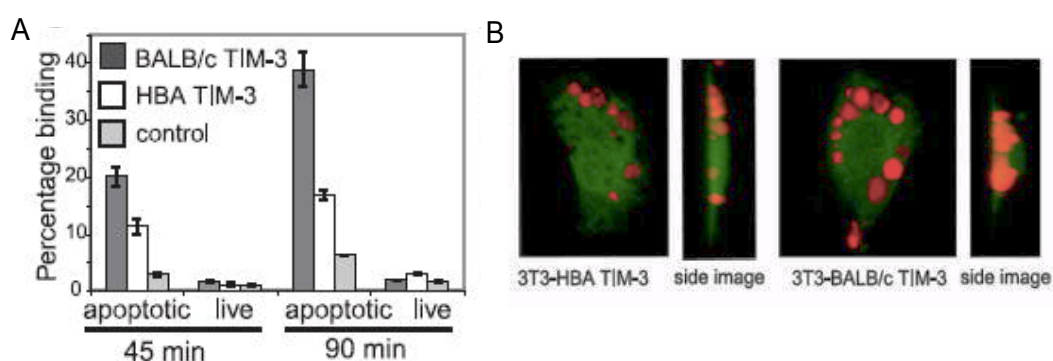


Figura 5.5. Unión y fagocitosis de células apoptóticas por las variantes HBA y BALB/c de mTIM-3. A. Porcentaje de células sanas y apoptóticas unidas a células 300.19 transfectadas con el vector PD-L1 (control), mTIM3-BALB/c o mTIM3-HBA. **B.** Imágenes de microscopía confocal de una célula NIH-3T3 transfectada con mTIM3-BALB/c o con mTIM3-HBA (verde) tras fagocitar células apoptóticas (rojo).

5.3.7. Observaciones finales.

Los datos proporcionados durante este trabajo de Tesis sobre la interacción específica de la familia de proteínas TIM con la molécula de FS ha conducido a la identificación de una nueva función para estas proteínas como receptores de FS expuesta en la superficie de células apoptóticas. La eliminación de las células apoptóticas del organismo es un proceso clave en el mantenimiento de la homeostasis y el desarrollo de tolerancia inmunológica. Así mismo, el proceso de fagocitosis de células apoptóticas

puede desencadenar un efecto antiinflamatorio e inmunosupresor. La implicación de las proteínas TIM en la eliminación de células apoptóticas muestra cómo esta familia de proteínas puede regular la tolerancia inmunológica y la inflamación.

Las proteínas TIM se expresan en diferentes tipos celulares del sistema inmunológico y en células en diferente estado de activación o diferenciación, median el reconocimiento y la eliminación de células apoptóticas, y además, son capaces de determinar si el proceso de eliminación de células apoptóticas conduce a la activación del sistema inmune o a el desarrollo de tolerancia inmunológica dependiendo de la proteína TIM implicada en el proceso y del tipo celular en que ésta se exprese. La existencia de otros receptores de FS capaces de mediar el reconocimiento y la eliminación de células apoptóticas, expresados en diferentes tipos celulares o con diferentes tipos de dominios de unión a FS puede ser significativo de la especificidad del proceso de fagocitosis (34). Aunque otros receptores de FS descritos hasta la fecha también median la fagocitosis de células apoptóticas, no parecen tener una relación tan clara con el sistema inmunológico como las proteínas TIM, ya que su expresión celular no está restringida a células del sistema inmune (48, 125), o por el contrario, tienen su expresión restringida a un tipo celular concreto no relacionado (99).

El estudio de la interacción de las proteínas TIM con FS expuesta en células apoptóticas podría ayudarnos a entender mejor la patología de las diferentes enfermedades en las que las proteínas TIM están implicadas, como el asma, la tolerancia inmunológica, la autoinmunidad y su papel en la respuesta frente a una infección viral. Los datos estructurales, bioquímicos y biofísicos de la interacción de las proteínas TIM con FS obtenidos en este trabajo de Tesis podrían facilitar el diseño de moléculas terapéuticas capaces de modular la función de dichas proteínas.

6. CONCLUSIONES:

Las conclusiones obtenidas durante el desarrollo de este proyecto de Tesis se enumeran a continuación:

1. Las estructuras cristalográficas de los dominios N-terminales de las proteínas TIM murinas han mostrado que adoptan un plegamiento de inmunoglobulina (Ig) del tipo variable V (IgV).
2. Las estructuras de los dominios IgV de las proteínas TIM murinas han mostrado una conformación única para el lazo CC' entre receptores celulares de la superfamilia de las inmunoglobulinas. La conformación del lazo está conservada en todas las proteínas TIM, excepto en mTIM-2, proteína que presenta ciertas peculiaridades estructurales, divergiendo del resto.
3. La estructura cristalográfica del dominio N-terminal de mTIM-4 ha mostrado la presencia de un bolsillo molecular de unión a ligandos en la parte superior del dominio. Este bolsillo contiene un sitio de coordinación de metal, por lo que se ha denominado MILIBS (Metal Ion-dependent Ligand Binding Site). El MILIBS está conservado en todas las proteínas TIM, excepto en mTIM-2.
4. El MILIBS está constituido por el lazo CC', que presenta una conformación única en las proteínas TIM, y por el lazo FG, localizado en el extremo del dominio más distante de la membrana celular. El MILIBS es un elemento característico de las proteínas TIM dentro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, que previsiblemente condicionará el reconocimiento de ligandos y su función en el sistema inmunitario.
5. Estudios bioquímicos y estructurales incluidos en esta Tesis han mostrado que las proteínas TIM-1, TIM-3 y TIM-4 son receptores específicos de FS, un fosfolípido señal de muerte celular.

6. Las estructuras cristalográficas de mTIM-3 y mTIM-4 en complejo con FS han identificado el modo de unión de las proteínas TIM a FS, mostrando que el MILIBS es un bolsillo de unión a ligandos fisiológicos como FS.
7. La cabeza polar de la FS penetra en el MILIBS, de forma que el fosfato se coordina con el ión metálico localizado en el bolsillo, mientras que la serina interacciona con residuos proteicos conservados. La región apolar del fosfolípido contacta con las paredes del bolsillo, formadas por residuos hidrofóbicos.
8. Los residuos hidrofóbicos que constituyen las paredes del MILIBS o los residuos proteicos conservados que coordinan el ion metálico son fundamentales para la unión de las proteínas TIM a FS.
9. El análisis biofísico de la interacción de las proteínas TIM con FS en membranas indica que los residuos hidrofóbicos en las paredes del MILIBS penetran en la membrana. La afinidad de las proteínas TIM monoméricas por FS es del orden de $0,35 \times 10^{-6}$ M (K_D) para mTIM-1 y mTIM-4, y ligeramente menor para mTIM-3 (1×10^{-6} M). Las cinéticas de interacción son relativamente rápidas, con k_{on} del orden de $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y k_{dis} del orden de 10^{-2} s^{-1} .
10. Los polimorfismos descritos para mTIM-1 y mTIM-3, relacionados con susceptibilidad al desarrollo de asma, condicionan la afinidad de estas proteínas por FS en membranas. En el caso de mTIM-3, los residuos polimórficos localizan en una región del dominio IgV próxima al MILIBS, y parecen interaccionar directamente con la membrana. En mTIM-1 localizan en el dominio de mucina, que no interacciona con FS, pero parecen determinar la conformación de la proteína en la membrana celular y por lo tanto su capacidad de unión a FS. Estos resultados ayudarán a entender la relación de estos polimorfismos con enfermedades como asma y inmunidad.

7. BIBLIOGRAFÍA:

1. **Albacker, L. A., P. Karisola, Y. J. Chang, S. E. Umetsu, M. Zhou, O. Akbari, N. Kobayashi, N. Baumgarth, G. J. Freeman, D. T. Umetsu, and R. H. DeKruyff.** 2010. TIM-4, a receptor for phosphatidylserine, controls adaptive immunity by regulating the removal of antigen-specific T cells. *Journal of immunology* **185**:6839-6849.
2. **Anderson, A. C., D. E. Anderson, L. Bregoli, W. D. Hastings, N. Kassam, C. Lei, R. Chandwaskar, J. Karman, E. W. Su, M. Hirashima, J. N. Bruce, L. P. Kane, V. K. Kuchroo, and D. A. Hafler.** 2007. Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells. *Science* **318**:1141-1143.
3. **Asano, K., M. Miwa, K. Miwa, R. Hanayama, H. Nagase, S. Nagata, and M. Tanaka.** 2004. Masking of phosphatidylserine inhibits apoptotic cell engulfment and induces autoantibody production in mice. *The Journal of experimental medicine* **200**:459-467.
4. **Bettache, N., P. Gaffet, N. Allegre, L. Maurin, F. Toti, J. M. Freyssinet, and A. Bienvenue.** 1998. Impaired redistribution of aminophospholipids with distinctive cell shape change during Ca²⁺-induced activation of platelets from a patient with Scott syndrome. *Br J Haematol* **101**:50-58.
5. **Bewley, M. C., K. Springer, Y. B. Zhang, P. Freimuth, and J. M. Flanagan.** 1999. Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR. *Science* **286**:1579-1583.
6. **Binne, L. L., M. L. Scott, and P. D. Rennert.** 2007. Human TIM-1 associates with the TCR complex and up-regulates T cell activation signals. *J Immunol* **178**:4342-4350.
7. **Bork, P., L. Holm, and C. Sander.** 1994. The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *J Mol Biol* **242**:309-320.
8. **Brown, S., I. Heinisch, E. Ross, K. Shaw, C. D. Buckley, and J. Savill.** 2002. Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature* **418**:200-203.
9. **Brunger, A. T., P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J.-S. Jiang, J. Kuszewski, N. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson, and G. L. Warren.** 1998. Crystallography and NMR system (CNS): A new software system for macromolecular structure determination. *Acta Cryst. D* **54**:905-921.
10. **Cao, E., X. Zang, U. A. Ramagopal, A. Mukhopadhyaya, A. Fedorov, E. Fedorov, W. D. Zencheck, J. W. Lary, J. L. Cole, H. Deng, H. Xiao, T. P. D'Irenzo, J. P. Allison, S. G. Nathenson, and S. C. Almo.** 2007. T cell immunoglobulin mucin-3 crystal structure reveals a galectin-9-independent ligand-binding surface. *Immunity* **26**:311-321.
11. **Casasnovas, J. M., R. R. Reed, and T. A. Springer.** 1994. Kinetics of receptor and virus interaction and receptor-induced virus disruption: Methods for study with surface plasmon resonance. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* **6**:157-167.
12. **Casasnovas, J. M., and T. A. Springer.** 1995. Kinetics and thermodynamics of virus binding to receptor: Studies with rhinovirus, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and surface plasmon resonance. *J.Biol.Chem.* **270**:13216-13224.

13. **Chae, S. C., Y. R. Park, S. C. Shim, K. S. Yoon, and H. T. Chung.** 2004. The polymorphisms of Th1 cell surface gene Tim-3 are associated in a Korean population with rheumatoid arthritis. *Immunol Lett* **95**:91-95.
14. **Chae, S. C., J. H. Song, P. Pounsambath, H. Y. Yuan, J. H. Lee, J. J. Kim, Y. C. Lee, and H. T. Chung.** 2004. Molecular variations in Th1-specific cell surface gene Tim-3. *Exp Mol Med* **36**:274-278.
15. **Chae, S. C., J. H. Song, S. C. Shim, K. S. Yoon, and H. T. Chung.** 2004. The exon 4 variations of Tim-1 gene are associated with rheumatoid arthritis in a Korean population. *Biochem Biophys Res Commun* **315**:971-975.
16. **Chakravarti, S.** 2005. Tim-2 regulates T helper type 2 responses and autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine* **202**:437-444.
17. **Chen, T. T., L. Li, D. H. Chung, C. D. Allen, S. V. Torti, F. M. Torti, J. G. Cyster, C. Y. Chen, F. M. Brodsky, E. C. Niemi, M. C. Nakamura, W. E. Seaman, and M. R. Daws.** 2005. TIM-2 is expressed on B cells and in liver and kidney and is a receptor for H-ferritin endocytosis. *J Exp Med* **202**:955-965.
18. **Collaborative Computational Project, N.** 1994. The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst. D* **50**:760-763.
19. **Cooper, M. A., A. Hansson, S. Lofas, and D. H. Williams.** 2000. A vesicle capture sensor chip for kinetic analysis of interactions with membrane-bound receptors. *Anal Biochem* **277**:196-205.
20. **Cruz, A., and J. Perez-Gil.** 2007. Langmuir films to determine lateral surface pressure on lipid segregation. *Methods Mol Biol* **400**:439-457.
21. **D'Souza, S. E., M. H. Ginsberg, and E. F. Plow.** 1991. Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. *Trends Biochem Sci* **16**:246-250.
22. **Damai, R. S., V. Anbazhagan, K. B. Rao, and M. J. Swamy.** 2009. Fluorescence studies on the interaction of choline-binding domain B of the major bovine seminal plasma protein, PDC-109 with phospholipid membranes. *Biochim Biophys Acta* **1794**:1725-1733.
23. **de Souza, A. J., T. B. Oriss, K. J. O'Malley, A. Ray, and L. P. Kane.** 2005. T cell Ig and mucin 1 (TIM-1) is expressed on in vivo-activated T cells and provides a costimulatory signal for T cell activation. *PNAS* **102**:17113-17118.
24. **Degauque, N., C. Mariat, J. Kenny, D. Zhang, W. Gao, M. D. Vu, S. Alexopoulos, M. Oukka, D. T. Umetsu, R. H. DeKruyff, V. Kuchroo, X. X. Zheng, and T. B. Strom.** 2008. Immunostimulatory Tim-1-specific antibody deprograms Tregs and prevents transplant tolerance in mice. *J Clin Invest* **118**:735-741.
25. **Dekkers, D. W., P. Comfurius, W. M. Vuist, J. T. Billheimer, I. Dicker, H. J. Weiss, R. F. Zwaal, and E. M. Bevers.** 1998. Impaired Ca²⁺-induced tyrosine phosphorylation and defective lipid scrambling in erythrocytes from a patient with Scott syndrome: a study using an inhibitor for scramblase that mimics the defect in Scott syndrome. *Blood* **91**:2133-2138.
26. **DeKruyff, R. H., X. Bu, A. Ballesteros, C. Santiago, Y. L. Chim, H. H. Lee, P. Karisola, M. Pichavant, G. G. Kaplan, D. T. Umetsu, G. J. Freeman, and J. M. Casasnovas.** 2010. T cell/transmembrane, Ig, and mucin-3 allelic variants differentially recognize phosphatidylserine and mediate phagocytosis of apoptotic cells. *J Immunol* **184**:1918-1930.
27. **Devitt, A., K. G. Parker, C. A. Ogden, C. Oldreive, M. F. Clay, L. A. Melville, C. O. Bellamy, A. Lacy-Hulbert, S. C. Gangloff, S. M. Goyert, and C. D. Gregory.** 2004. Persistence of apoptotic cells without autoimmune disease or inflammation in CD14^{-/-} mice. *J Cell Biol* **167**:1161-1170.

28. **Devitt, A., S. Pierce, C. Oldreive, W. H. Shingler, and C. D. Gregory.** 2003. CD14-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages: the role of phosphatidylserine. *Cell Death Differ* **10**:371-382.
29. **Dillon, S. R., M. Mancini, A. Rosen, and M. S. Schlissel.** 2000. Annexin V binds to viable B cells and colocalizes with a marker of lipid rafts upon B cell receptor activation. *Journal of immunology* **164**:1322-1332.
30. **Dougherty, D. A.** 1996. Cation- π Interactions in Chemistry and Biology: A New View of Benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science* **271**:163-168.
31. **Edouard M. Bevers *, P. C., David W.C. Dekkers, Robert F.A. Zwaal.** 1999. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* **1439**:317-330.
32. **Encinas, J. A., E. M. Janssen, D. B. Weiner, S. A. Calarota, D. Nieto, T. Moll, D. J. Carlo, and R. B. Moss.** 2005. Anti-T-cell Ig and mucin domain-containing protein 1 antibody decreases TH2 airway inflammation in a mouse model of asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* **116**:1343-1349.
33. **Eswar, N., B. Webb, M. A. Marti-Renom, M. S. Madhusudhan, D. Eramian, M. Y. Shen, U. Pieper, and A. Sali.** 2007. Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 2**:Unit 2 9.
34. **Fadok, V. A., D. L. Bratton, and P. M. Henson.** 2001. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest* **108**:957-962.
35. **Feigelstock, D., P. Thompson, P. Mattoo, and G. G. Kaplan.** 1998. Polymorphisms of the hepatitis A virus cellular receptor 1 in African green monkey kidney cells result in antigenic variants that do not react with protective monoclonal antibody 190/4. *J. Virol.* **72**:6218-6222.
36. **Feigelstock, D., P. Thompson, P. Mattoo, Y. Zhang, and G. G. Kaplan.** 1998. The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor. *J. Virol.* **72**:6621-6628.
37. **Fischer, K., S. Voelkl, J. Berger, R. Andreesen, T. Pomorski, and A. Mackensen.** 2006. Antigen recognition induces phosphatidylserine exposure on the cell surface of human CD8⁺ T cells. *Blood* **108**:4094-4101.
38. **Fomina, A. F., T. J. Deerinck, M. H. Ellisman, and M. D. Cahalan.** 2003. Regulation of membrane trafficking and subcellular organization of endocytic compartments revealed with FM1-43 in resting and activated human T cells. *Exp Cell Res* **291**:150-166.
39. **Frasch, S. C., P. M. Henson, K. Nagaosa, M. B. Fessler, N. Borregaard, and D. L. Bratton.** 2004. Phospholipid flip-flop and phospholipid scramblase 1 (PLSCR1) co-localize to uropod rafts in formylated Met-Leu-Phe-stimulated neutrophils. *The Journal of biological chemistry* **279**:17625-17633.
40. **Freeman, G. J., J. M. Casasnovas, D. T. Umetsu, and R. H. DeKruyff.** 2010. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunological reviews* **235**:172-189.
41. **Gao, P.-S., R. A. Mathias, B. Plunkett, A. Togias, K. C. Barnes, T. H. Beaty, and S.-K. Huang.** 2005. Genetic variants of the T-cell immunoglobulin mucin 1 but not the T-cell immunoglobulin mucin 3 gene are associated with asthma in an African American population. *Journal of Allergy and Clinical Immunology, The* **115**:982-988.
42. **Gerads, I., J. W. Govers-Riemslog, G. Tans, R. F. Zwaal, and J. Rosing.** 1990. Prothrombin activation on membranes with anionic lipids containing phosphate, sulfate, and/or carboxyl groups. *Biochemistry* **29**:7967-7974.

43. **Gieni, R. S., Y. Fang, G. Trinchieri, D. T. Umetsu, and R. H. DeKruyff.** 1996. Differential production of IL-12 in BALB/c and DBA/2 mice controls IL-4 versus IFN-gamma synthesis in primed CD4 lymphocytes. *International immunology* **8**:1511-1520.
44. **Gilbert, G. E., B. C. Furie, and B. Furie.** 1990. Binding of human factor VIII to phospholipid vesicles. *J Biol Chem* **265**:815-822.
45. **Graves, P. E., V. Siroux, S. Guerra, W. T. Klimecki, and F. D. Martinez.** 2005. Association of atopy and eczema with polymorphisms in T-cell immunoglobulin domain and mucin domain-IL-2-inducible T-cell kinase gene cluster in chromosome 5 q 33. *The Journal of allergy and clinical immunology* **116**:650-656.
46. **Gude, D. R., S. E. Alvarez, S. W. Paugh, P. Mitra, J. Yu, R. Griffiths, S. E. Barbour, S. Milstien, and S. Spiegel.** 2008. Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a "come-and-get-me" signal. *Faseb J* **22**:2629-2638.
47. **Gumienny, T. L., E. Brugnera, A. C. Tosello-Trampont, J. M. Kinchen, L. B. Haney, K. Nishiwaki, S. F. Walk, M. E. Nemergut, I. G. Macara, R. Francis, T. Schedl, Y. Qin, L. Van Aelst, M. O. Hengartner, and K. S. Ravichandran.** 2001. CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell* **107**:27-41.
48. **Hanayama, R., M. Tanaka, K. Miwa, A. Shinohara, A. Iwamatsu, and S. Nagata.** 2002. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* **417**:182-187.
49. **Hanayama, R., M. Tanaka, K. Miyasaka, K. Aozasa, M. Koike, Y. Uchiyama, and S. Nagata.** 2004. Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science* **304**:1147-1150.
50. **Harris, E. N., J. A. Weigel, and P. H. Weigel.** 2008. The human hyaluronan receptor for endocytosis (HARE/Stabilin-2) is a systemic clearance receptor for heparin. *The Journal of biological chemistry* **283**:17341-17350.
51. **Hastings, W. D., D. E. Anderson, N. Kassam, K. Koguchi, E. A. Greenfield, S. C. Kent, X. X. Zheng, T. B. Strom, D. A. Hafler, and V. K. Kuchroo.** 2009. TIM-3 is expressed on activated human CD4+ T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines. *Eur J Immunol* **39**:2492-2501.
52. **Heinzel, S. S., P. J. Krysan, M. P. Calos, and R. B. DuBridge.** 1988. Use of simian virus 40 replication to amplify Epstein-Barr virus shuttle vectors in human cells. *J Virol* **62**:3738-3746.
53. **Hoffmann, P. R., A. M. deCathelineau, C. A. Ogden, Y. Leverrier, D. L. Bratton, D. L. Daleke, A. J. Ridley, V. A. Fadok, and P. M. Henson.** 2001. Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J Cell Biol* **155**:649-659.
54. **Huang, M., A. C. Rigby, X. Morelli, M. A. Grant, G. Huang, B. Furie, B. Seaton, and B. C. Furie.** 2003. Structural basis of membrane binding by Gla domains of vitamin K-dependent proteins. *Nature structural biology* **10**:751-756.
55. **Hughson, F. M.** 1997. Enveloped viruses: a common mode of membrane fusion? *Current biology : CB* **7**:R565-569.
56. **Huo, W., K. Zhang, Z. Nie, Q. Li, and F. Jin.** 2010. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel kidney-specific injury molecule playing potential double-edged functions in kidney injury. *Transplant Rev (Orlando)* **24**:143-146.
57. **Ichimura, T., J. V. Bonventre, V. Bailly, H. Wei, C. A. Hession, R. L. Cate, and M. Sanicola.** 1998. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell

- adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem* **273**:4135-4142.
58. **Jimenez, D., P. Roda, T. A. Springer, and J. M. Casasnovas.** 2005. Contribution of N-linked glycans to the conformation and function of intercellular adhesion molecules (ICAMs). *J. Biol. Chem.* **280**:5854-5861.
 59. **Jones, E. Y., S. J. Davis, A. F. Williams, K. Harlos, and D. I. Stuart.** 1992. Crystal structure at 2.8 Å resolution of a soluble form of the cell adhesion molecule CD2. *Nature* **360**:232-239.
 60. **Kabsch, W.** 1993. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Cryst.* **26**:795-800.
 61. **Kaplan, G., A. Totsuka, P. Thompson, T. Akatsuka, Y. Moritsugu, and S. M. Feinstone.** 1996. Identification of a surface glycoprotein on african green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *EMBO J.* **15**:4282-4296.
 62. **Kato, N., M. Nakanishi, and N. Hirashima.** 2002. Transbilayer asymmetry of phospholipids in the plasma membrane regulates exocytotic release in mast cells. *Biochemistry* **41**:8068-8074.
 63. **Kawane, K., H. Fukuyama, G. Kondoh, J. Takeda, Y. Ohsawa, Y. Uchiyama, and S. Nagata.** 2001. Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Science* **292**:1546-1549.
 64. **Kawane, K., M. Ohtani, K. Miwa, T. Kizawa, Y. Kanbara, Y. Yoshioka, H. Yoshikawa, and S. Nagata.** 2006. Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature* **443**:998-1002.
 65. **Khademi, M., Z. Illes, A. W. Gielen, M. Marta, N. Takazawa, C. Baecher-Allan, L. Brundin, J. Hannerz, C. Martin, R. A. Harris, D. A. Hafler, V. K. Kuchroo, T. Olsson, F. Piehl, and E. Wallstrom.** 2004. T Cell Ig- and mucin-domain-containing molecule-3 (TIM-3) and TIM-1 molecules are differentially expressed on human Th1 and Th2 cells and in cerebrospinal fluid-derived mononuclear cells in multiple sclerosis. *J Immunol* **172**:7169-7176.
 66. **Khalifa, M. B., L. Choulier, H. Lortat-Jacob, D. Altschuh, and T. Vernet.** 2001. BIACORE data processing: an evaluation of the global fitting procedure. *Anal Biochem* **293**:194-203.
 67. **Kim, H. Y., M. B. Eyheramonho, M. Pichavant, C. Gonzalez Cambaceres, P. Matangkasombut, G. Cervio, S. Kuperman, R. Moreiro, K. Konduru, M. Manangeeswaran, G. J. Freeman, G. G. Kaplan, R. H. DeKruyff, D. T. Umetsu, and S. D. Rosenzweig.** 2011. A polymorphism in TIM1 is associated with susceptibility to severe hepatitis A virus infection in humans. *J Clin Invest* **121**:1111-1118.
 68. **Kinchen, J. M., K. Doukometzidis, J. Almendinger, L. Stergiou, A. Tosello-Trampont, C. D. Sifri, M. O. Hengartner, and K. S. Ravichandran.** 2008. A pathway for phagosome maturation during engulfment of apoptotic cells. *Nat Cell Biol* **10**:556-566.
 69. **Kinchen, J. M., and a. K. S. Ravichandran.** 2008. Phagocytic Signaling: You Can Touch, but You Can't Eat. *Current Biology* **18**.
 70. **Kobayashi, N., P. Karisola, V. Pena-Cruz, D. M. Dorfman, M. Jinushi, S. E. Umetsu, M. J. Butte, H. Nagumo, I. Chernova, B. Zhu, A. H. Sharpe, S. Ito, G. Dranoff, G. G. Kaplan, J. M. Casasnovas, D. T. Umetsu, R. H. Dekruyff, and G. J. Freeman.** 2007. TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. *Immunity* **27**:927-940.
 71. **Kobayashi, N., P. Karisola, V. Peña-Cruz, D. M. Dorfman, M. Jinushi, S. E. Umetsu, M. J. Butte, H. Nagumo, I. Chernova, B. Zhu, A. H. Sharpe, S. Ito, G.**

- Dranoff, G. G. Kaplan, J. M. Casasnovas, D. T. Umetsu, R. H. DeKruyff, and G. J. Freeman.** 2007. TIM-1 and TIM-4 Glycoproteins Bind Phosphatidylserine and Mediate Uptake of Apoptotic Cells. *Immunity* **27**:927-940.
72. **Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M. E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, and G. Melino.** 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* **16**:3-11.
 73. **Krysko, D. V., K. D'Herde, and P. Vandenabeele.** 2006. Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis* **11**:1709-1726.
 74. **Kuchroo, V. K., D. T. Umetsu, R. H. DeKruyff, and G. J. Freeman.** 2003. The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **3**:454-462.
 75. **Kumanogoh, A., S. Marukawa, K. Suzuki, N. Takegahara, C. Watanabe, E. Ch'ng, I. Ishida, H. Fujimura, S. Sakoda, K. Yoshida, and H. Kikutani.** 2002. Class IV semaphorin Sema4A enhances T-cell activation and interacts with Tim-2. *Nature* **419**:629-633.
 76. **Kwong, P. D., R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, and W. A. Hendrickson.** 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**:648-659.
 77. **Lauber, K., E. Bohn, S. M. Krober, Y. J. Xiao, S. G. Blumenthal, R. K. Lindemann, P. Marini, C. Wiedig, A. Zobywalski, S. Baksh, Y. Xu, I. B. Autenrieth, K. Schulze-Osthoff, C. Belka, G. Stuhler, and S. Wesselborg.** 2003. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* **113**:717-730.
 78. **Lee, H. H., E. H. Meyer, S. Goya, M. Pichavant, H. Y. Kim, X. Bu, S. E. Umetsu, J. C. Jones, P. B. Savage, Y. Iwakura, J. M. Casasnovas, G. Kaplan, G. J. Freeman, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu.** 2010. Apoptotic cells activate NKT cells through T cell Ig-like mucin-like-1 resulting in airway hyperreactivity. *Journal of immunology* **185**:5225-5235.
 79. **Lemmon, M. A.** 2008. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**:99-111.
 80. **Leventis, P. A., and S. Grinstein.** 2010. The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu Rev Biophys* **39**:407-427.
 81. **Li, J. S., Q. J. Liu, P. Wang, H. C. Li, C. H. Wei, C. H. Guo, and Y. Q. Gong.** 2006. Absence of association between two insertion/deletion coding genetic polymorphisms of TIM-1 gene and asthma in Chinese Han population. *International journal of immunogenetics* **33**:417-422.
 82. **Li, W. X., G. M. Chen, H. Yuan, Y. S. Yao, R. J. Li, H. F. Pan, X. P. Li, J. H. Xu, J. H. Tao, and D. Q. Ye.** 2011. Polymorphisms of the TIM-1 and TIM-3 genes are not associated with systemic lupus erythematosus in a Chinese population. *Mutagenesis* **26**:507-511.
 83. **Liangos, O., H. Tighiouart, M. C. Perianayagam, A. Kolyada, W. K. Han, R. Wald, J. V. Bonventre, and B. L. Jaber.** 2009. Comparative analysis of urinary biomarkers for early detection of acute kidney injury following cardiopulmonary bypass. *Biomarkers* **14**:423-431.
 84. **Lleo, A., C. Selmi, P. Invernizzi, M. Podda, and M. E. Gershwin.** 2008. The consequences of apoptosis in autoimmunity. *Journal of autoimmunity* **31**:257-262.

85. **Macedo-Ribeiro, S., W. Bode, R. Huber, M. A. Quinn-Allen, S. W. Kim, T. L. Ortel, G. P. Bourenkov, H. D. Bartunik, M. T. Stubbs, W. H. Kane, and P. Fuentes-Prior.** 1999. Crystal structures of the membrane-binding C2 domain of human coagulation factor V. *Nature* **402**:434-439.
86. **Majumder, R., M. A. Quinn-Allen, W. H. Kane, and B. R. Lentz.** 2008. A phosphatidylserine binding site in factor Va C1 domain regulates both assembly and activity of the prothrombinase complex. *Blood* **112**:2795-2802.
87. **Majumder, R., M. A. Quinn-Allen, W. H. Kane, and B. R. Lentz.** 2005. The phosphatidylserine binding site of the factor Va C2 domain accounts for membrane binding but does not contribute to the assembly or activity of a human factor Xa-factor Va complex. *Biochemistry* **44**:711-718.
88. **Martyn D. Winn, G. N. M., and Miroslav Z. Papiz.** 2003. Macromolecular TLS Refinement in REFMAC at Moderate Resolutions. *METHODS IN ENZYMOLOGY*, **374**:300-321.
89. **McCoy, A. J., R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, and R. J. Read.** 2007. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Cryst.* **40**:658-674.
90. **McIntire, J. J., D. T. Umetsu, and R. H. DeKruyff.** 2004. TIM-1, a novel allergy and asthma susceptibility gene. *Springer Semin Immunopathol* **25**:335-348.
91. **McIntire, J. J., S. E. Umetsu, O. Akbari, M. Potter, V. K. Kuchroo, G. S. Barsh, G. J. Freeman, D. T. Umetsu, and R. H. DeKruyff.** 2001. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nature Immunology* **2**:1109-1116.
92. **McIntire, J. J., S. E. Umetsu, C. Macaubas, E. G. Hoyte, C. Cinnioğlu, L. L. Cavalli-Sforza, G. S. Barsh, J. F. Hallmayer, P. A. Underhill, N. J. Risch, G. J. Freeman, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu.** 2003. Immunology/Hepatitis A virus link to atopic disease. *Nature* **425**:576-576.
93. **Mevorach, D., J. L. Zhou, X. Song, and K. B. Elkon.** 1998. Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production. *The Journal of experimental medicine* **188**:387-392.
94. **Meyers, J. H., S. Chakravarti, D. Schlesinger, Z. Illes, H. Waldner, S. E. Umetsu, J. Kenny, X. X. Zheng, D. T. Umetsu, R. H. DeKruyff, T. B. Strom, and V. K. Kuchroo.** 2005. TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1-TIM-4 interaction regulates T cell proliferation. *Nat Immunol* **6**:455-464.
95. **Miyake, Y., K. Asano, H. Kaise, M. Uemura, M. Nakayama, and M. Tanaka.** 2007. Critical role of macrophages in the marginal zone in the suppression of immune responses to apoptotic cell-associated antigens. *J Clin Invest* **117**:2268-2278.
96. **Miyashita, M., K. Tada, M. Koike, Y. Uchiyama, T. Kitamura, and S. Nagata.** 2007. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* **450**:435-439.
97. **Mizushima, S., and S. Nagata.** 1990. PEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res* **18**:5322.
98. **Monney, L., C. A. Sabatos, J. L. Gaglia, A. Ryu, H. Waldner, T. Chernova, S. Manning, E. A. Greenfield, A. J. Coyle, R. A. Sobel, G. J. Freeman, and V. K. Kuchroo.** 2002. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* **415**:536-541.
99. **Mori, K., Y. Kanemura, H. Fujikawa, A. Nakano, H. Ikemoto, I. Ozaki, T. Matsumoto, K. Tamura, M. Yokota, and N. Arita.** 2002. Brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI1) is expressed in human cerebral neuronal cells. *Neurosci Res* **43**:69-74.

100. **Mou, Z., J. Shi, Y. Tan, R. Xu, Z. Zhao, G. Xu, and H. Li.** 2010. Association between TIM-1 gene polymorphisms and allergic rhinitis in a Han Chinese population. *J Invest Allergol Clin Immunol* **20**:3-8.
101. **Murshudov, G. N., A. A. Vagin, and E. J. Dodson.** 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53**:240-255.
102. **Nagata, S., R. Hanayama, and K. Kawane.** 2010. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* **140**:619-630.
103. **Nakae, S., M. Iikura, H. Suto, H. Akiba, D. T. Umetsu, R. H. Dekruyff, H. Saito, and S. J. Galli.** 2007. TIM-1 and TIM-3 enhancement of Th2 cytokine production by mast cells. *Blood* **110**:2565-2568.
104. **Nakae, S., Y. Iwakura, H. Suto, and S. J. Galli.** 2007. Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17. *Journal of leukocyte biology* **81**:1258-1268.
105. **Nakajima, T., S. Wooding, Y. Satta, N. Jinnai, S. Goto, I. Hayasaka, N. Saitou, J. Guan-Jun, K. Tokunaga, L. B. Jorde, M. Emi, and I. Inoue.** 2005. Evidence for natural selection in the HAVCR1 gene: high degree of amino-acid variability in the mucin domain of human HAVCR1 protein. *Genes and immunity* **6**:398-406.
106. **Nakayama, M., H. Akiba, K. Takeda, Y. Kojima, M. Hashiguchi, M. Azuma, H. Yagita, and K. Okumura.** 2009. Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation. *Blood* **113**:3821-3830.
107. **Nalefski, E. A., T. McDonagh, W. Somers, J. Seehra, J. J. Falke, and J. D. Clark.** 1998. Independent folding and ligand specificity of the C2 calcium-dependent lipid binding domain of cytosolic phospholipase A2. *The Journal of biological chemistry* **273**:1365-1372.
108. **Nonaka, H., M. Tanaka, K. Suzuki, and A. Miyajima.** 2007. Development of murine hepatic sinusoidal endothelial cells characterized by the expression of hyaluronan receptors. *Dev Dyn* **236**:2258-2267.
109. **Nuchnoi, P., J. Ohashi, R. Kimura, H. Hananantachai, I. Naka, S. Krudsood, S. Looareesuwan, K. Tokunaga, and J. Patarapotikul.** 2008. Significant association between TIM1 promoter polymorphisms and protection against cerebral malaria in Thailand. *Ann Hum Genet* **72**:327-336.
110. **Park, D., A. Hochreiter-Hufford, and K. S. Ravichandran.** 2009. The phosphatidylserine receptor TIM-4 does not mediate direct signaling. *Current biology : CB* **19**:346-351.
111. **Park, D., A. C. Tosello-Tramont, M. R. Elliott, M. Lu, L. B. Haney, Z. Ma, A. L. Klivanov, J. W. Mandell, and K. S. Ravichandran.** 2007. BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature* **450**:430-434.
112. **Park, S. Y., M. Y. Jung, H. J. Kim, S. J. Lee, S. Y. Kim, B. H. Lee, T. H. Kwon, R. W. Park, and I. S. Kim.** 2008. Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor. *Cell Death Differ* **15**:192-201.
113. **Parnaik, R., M. C. Raff, and J. Scholes.** 2000. Differences between the clearance of apoptotic cells by professional and non-professional phagocytes. *Current biology : CB* **10**:857-860.
114. **Pear, W. S., G. P. Nolan, M. L. Scott, and D. Baltimore.** 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**:8392-8396.

115. **Peng, Y., D. A. Martin, J. Kenkel, K. Zhang, C. A. Ogden, and K. B. Elkon.** 2007. Innate and adaptive immune response to apoptotic cells. *Journal of autoimmunity* **29**:303-309.
116. **Perez-Gil, J., J. Tucker, G. Simatos, and K. M. Keough.** 1992. Interfacial adsorption of simple lipid mixtures combined with hydrophobic surfactant protein from pig lung. *Biochem Cell Biol* **70**:332-338.
117. **Petty, M. C.** 1996. *Langmuir-Blodgett films : an introduction*. Cambridge University Press, Cambridge.
118. **Plasencia, I., K. M. Keough, and J. Perez-Gil.** 2005. Interaction of the N-terminal segment of pulmonary surfactant protein SP-C with interfacial phospholipid films. *Biochim Biophys Acta* **1713**:118-128.
119. **Pratt, K. P., B. W. Shen, K. Takeshima, E. W. Davie, K. Fujikawa, and B. L. Stoddard.** 1999. Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution. *Nature* **402**:439-442.
120. **R., M., B., S., K., D., G., A., S., H., S., and K.** 2008. TIM-4 Expressed on APCs Induces T Cell Expansion and Survival. *J Immunol* **180**:4706-4713.
121. **Rand, M. L., H. Wang, F. G. Pluthero, A. R. Stafford, R. Ni, N. Vaezzadeh, A. C. Allison, W. H. Kahr, J. I. Weitz, and P. L. Gross.** 2012. Diannexin, an annexin A5 homodimer, binds phosphatidylserine with high affinity and is a potent inhibitor of platelet-mediated events during thrombus formation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*.
122. **Rennert, P. D., T. Ichimura, I. D. Sizing, V. Bailly, Z. Li, R. Rennard, P. McCoon, L. Pablo, S. Miklasz, L. Tarilonte, and J. V. Bonventre.** 2006. T Cell, Ig Domain, Mucin Domain-2 Gene-Deficient Mice Reveal a Novel Mechanism for the Regulation of Th2 Immune Responses and Airway Inflammation. *The Journal of Immunology* **177**:4311-4321.
123. **Rodriguez-Manzanet, R., M. A. Sanjuan, H. Y. Wu, F. J. Quintana, S. Xiao, A. C. Anderson, H. L. Weiner, D. R. Green, and V. K. Kuchroo.** 2010. T and B cell hyperactivity and autoimmunity associated with niche-specific defects in apoptotic body clearance in TIM-4-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:8706-8711.
124. **Rothlin, C. V., S. Ghosh, E. I. Zuniga, M. B. Oldstone, and G. Lemke.** 2007. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell* **131**:1124-1136.
125. **Rothlin, C. V., and G. Lemke.** 2010. TAM receptor signaling and autoimmune disease. *Current opinion in immunology* **22**:740-746.
126. **Sabatos, C. A., S. Chakravarti, E. Cha, A. Schubart, A. Sanchez-Fueyo, X. X. Zheng, A. J. Coyle, T. B. Strom, G. J. Freeman, and V. K. Kuchroo.** 2003. Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nat. Immunol.* **4**:1102-1110.
127. **Sanchez-Fueyo, A., J. Tian, D. Picarella, C. Domenig, X. X. Zheng, C. A. Sabatos, N. Manlongat, O. Bender, T. Kamradt, V. K. Kuchroo, J. C. Gutierrez-Ramos, A. J. Coyle, and T. B. Strom.** 2003. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nat Immunol* **4**:1093-1101.
128. **Santiago, C., A. Ballesteros, L. Martinez-Munoz, M. Mellado, G. G. Kaplan, G. J. Freeman, and J. M. Casasnovas.** 2007. Structures of T cell immunoglobulin mucin protein 4 show a metal-Ion-dependent ligand binding site where phosphatidylserine binds. *Immunity* **27**:941-951.

129. **Santiago, C., A. Ballesteros, C. Tami, L. Martínez-Muñoz, G. G. Kaplan, and J. M. Casasnovas.** 2007. Structures of T Cell Immunoglobulin Mucin Receptors 1 and 2 Reveal Mechanisms for Regulation of Immune Responses by the TIM Receptor Family. *Immunity* **26**:299-310.
130. **Serrano, A. G., A. Cruz, K. Rodriguez-Capote, F. Possmayer, and J. Perez-Gil.** 2005. Intrinsic structural and functional determinants within the amino acid sequence of mature pulmonary surfactant protein SP-B. *Biochemistry* **44**:417-430.
131. **Shakhov, A. N., S. Rybtsov, A. V. Tumanov, S. Shulenin, M. Dean, D. V. Kuprash, and S. A. Nedospasov.** 2004. SMUCKLER/TIM4 is a distinct member of TIM family expressed by stromal cells of secondary lymphoid tissues and associated with lymphotoxin signaling. *Eur J Immunol* **34**:494-503.
132. **Shao, C., V. A. Novakovic, J. F. Head, B. A. Seaton, and G. E. Gilbert.** 2008. Crystal structure of lactadherin C2 domain at 1.7Å resolution with mutational and computational analyses of its membrane-binding motif. *The Journal of biological chemistry* **283**:7230-7241.
133. **Shi, J., and G. E. Gilbert.** 2003. Lactadherin inhibits enzyme complexes of blood coagulation by competing for phospholipid-binding sites. *Blood* **101**:2628-2636.
134. **Silberstein, E., G. Dveksler, and G. G. Kaplan.** 2001. Neutralization of hepatitis A virus (HAV) by an immunoadhesin containing the cysteine-rich region of HAV cellular receptor-1. *Journal of virology* **75**:717-725.
135. **Silberstein, E., K. Konduru, and G. G. Kaplan.** 2009. The interaction of hepatitis A virus (HAV) with soluble forms of its cellular receptor 1 (HAVCR1) share the physiological requirements of infectivity in cell culture. *Virol J* **6**:175.
136. **Silberstein, E., L. Xing, W. van de Beek, J. Lu, H. Cheng, and G. G. Kaplan.** 2003. Alteration of hepatitis A virus (HAV) particles by a soluble form of HAV cellular receptor 1 containing the immunoglobulin-and mucin-like regions. *J. Virol.* **77**:8765-8774.
137. **Sizing, I. D., V. Bailly, P. McCoon, W. Chang, S. Rao, L. Pablo, R. Rennard, M. Walsh, Z. Li, M. Zafari, M. Dobles, L. Tarilonte, S. Miklasz, G. Majeau, K. Godbout, M. L. Scott, and P. D. Rennert.** 2007. Epitope-dependent effect of anti-murine TIM-1 monoclonal antibodies on T cell activity and lung immune responses. *J Immunol* **178**:2249-2261.
138. **Soo Hoo, W., E. R. Jensen, A. Saadat, D. Nieto, R. B. Moss, D. J. Carlo, and T. Moll.** 2006. Vaccination with cell immunoglobulin mucin-1 antibodies and inactivated influenza enhances vaccine-specific lymphocyte proliferation, interferon-gamma production and cross-strain reactivity. *Clin Exp Immunol* **145**:123-129.
139. **Soriano-Garcia, M., K. Padmanabhan, A. M. de Vos, and A. Tulinsky.** 1992. The Ca²⁺ ion and membrane binding structure of the Gla domain of Ca-prothrombin fragment 1. *Biochemistry* **31**:2554-2566.
140. **Stace, C. L., and N. T. Ktistakis.** 2006. Phosphatidic acid- and phosphatidylserine-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* **1761**:913-926.
141. **Sun, E., Y. Gao, J. Chen, A. I. Roberts, X. Wang, Z. Chen, and Y. Shi.** 2004. Allograft tolerance induced by donor apoptotic lymphocytes requires phagocytosis in the recipient. *Cell Death Differ* **11**:1258-1264.
142. **Sutton, R. B., B. A. Davletov, A. M. Berghuis, T. C. Sudhof, and S. R. Sprang.** 1995. Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca²⁺/phospholipid-binding fold. *Cell* **80**:929-938.
143. **Swairjo, M. A., N. O. Concha, M. A. Kaetzel, J. R. Dedman, and B. A. Seaton.** 1995. Ca(2+)-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V. *Nat Struct Biol* **2**:968-974.

144. **Tamada, A., Y. Yoshihara, and K. Mori.** 1998. Dendrite-associated cell adhesion molecule, telencephalin, promotes neurite outgrowth in mouse embryo. *Neuroscience Letters* **240**:163-166.
145. **Tami, C., E. Silberstein, M. Manangeeswaran, G. J. Freeman, S. E. Umetsu, R. H. DeKruyff, D. T. Umetsu, and G. G. Kaplan.** 2007. Immunoglobulin A (IgA) is a natural ligand of hepatitis A virus cellular receptor 1 (HAVCR1), and the association of IgA with HAVCR1 enhances virus-receptor interactions. *J Virol* **81**:3437-3446.
146. **Tan, K., B. D. Zelus, R. Meijers, J.-h. Liu, J. M. Bergelson, N. Duke, R. Zhang, A. Joachimiak, K. V. Holmes, and J.-h. Wang.** 2002. Crystal structure of murine sCEACAM1a[1,4]: a coronavirus receptor in the CEA family. *Embo J* **21**:2076-2086.
147. **Terwilliger, T. C., R. W. Grosse-Kunstleve, P. V. Afonine, N. W. Moriarty, P. H. Zwart, L. W. Hung, R. J. Read, and P. D. Adams.** 2008. Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **64**:61-69.
148. **Thery, C., L. Zitvogel, and S. Amigorena.** 2002. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* **2**:569-579.
149. **Todorich, B., X. Zhang, B. Slagle-Webb, W. E. Seaman, and J. R. Connor.** 2008. Tim-2 is the receptor for H-ferritin on oligodendrocytes. *J Neurochem* **107**:1495-1505.
150. **Truman, L. A., C. A. Ford, M. Pasikowska, J. D. Pound, S. J. Wilkinson, I. E. Dumitriu, L. Melville, L. A. Melrose, C. A. Ogden, R. Nibbs, G. Graham, C. Combadiere, and C. D. Gregory.** 2008. CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood* **112**:5026-5036.
151. **Umetsu, S. E., W. L. Lee, J. J. McIntire, L. Downey, B. Sanjanwala, O. Akbari, G. J. Berry, H. Nagumo, G. J. Freeman, D. T. Umetsu, and R. H. DeKruyff.** 2005. TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. *Nat. Immunol.* **6**:447-454.
152. **VALERIE A. FADOK, D. R. V., " PRISCILLA A. CAMPBELL," J. JOHN COHEN,', and A. P. M. H. DONNA L. BRATTON.** 1992. EXPOSURE OF PHOSPHATIDYLSERINE ON THE SURFACE OF APOPTOTIC LYMPHOCYTES TRIGGERS SPECIFIC RECOGNITION AND REMOVAL BY MACROPHAGES. *THE JOURNAL of InMUNOLoGY* **148**:2207-2216.
153. **van de Weyer, P. S., M. Muehlfeit, C. Klose, J. V. Bonventre, G. Walz, and E. W. Kuehn.** 2006. A highly conserved tyrosine of Tim-3 is phosphorylated upon stimulation by its ligand galectin-9. *Biochem Biophys Res Commun* **351**:571-576.
154. **van der Merwe, P. A., M. H. Brown, S. J. Davis, and A. N. Barclay.** 1993. Affinity and kinetic analysis of the interaction of the cell adhesion molecules rat CD2 and CD48. *The EMBO journal* **12**:4945-4954.
155. **van Raaij, M. J., E. Chouin, H. van der Zandt, J. M. Bergelson, and S. Cusack.** 2000. Dimeric Structure of the Coxsackievirus and Adenovirus Receptor D1 Domain at 1.7 $\sqrt{\text{\AA}}$ Resolution. *Structure* **8**:1147-1155.
156. **Verdaguer, N., S. Corbalan-Garcia, W. F. Ochoa, I. Fita, and J. C. Gomez-Fernandez.** 1999. Ca(2+) bridges the C2 membrane-binding domain of protein kinase Calpha directly to phosphatidylserine. *Embo J* **18**:6329-6338.
157. **Wang, J., and T. A. Springer.** 1998. Structural specializations of immunoglobulin superfamily members for adhesion to integrins and viruses. *Immunol. Rev.* **163**:197-215.

158. **Wang, Z., W. J. Shufesky, A. Montecalvo, S. J. Divito, A. T. Larregina, and A. E. Morelli.** 2009. In situ-targeting of dendritic cells with donor-derived apoptotic cells restrains indirect allorecognition and ameliorates allograft vasculopathy. *PloS one* **4**:e4940.
159. **Wichukchinda, N., T. Nakajima, N. Saipradit, E. E. Nakayama, H. Ohtani, A. Rojanawiwat, P. Pathipvanich, K. Ariyoshi, P. Sawanpanyalert, T. Shioda, and A. Kimura.** 2010. TIM1 haplotype may control the disease progression to AIDS in a HIV-1-infected female cohort in Thailand. *Aids* **24**:1625-1631.
160. **Wilker, P. R., J. R. Sedy, V. Grigura, T. L. Murphy, and K. M. Murphy.** 2007. Evidence for carbohydrate recognition and homotypic and heterotypic binding by the TIM family. *Int Immunol* **19**:763-773.
161. **Williamson, P., A. Christie, T. Kohlin, R. A. Schlegel, P. Comfurius, M. Harmsma, R. F. Zwaal, and E. M. Bevers.** 2001. Phospholipid scramblase activation pathways in lymphocytes. *Biochemistry* **40**:8065-8072.
162. **Wolfs, J. L., P. Comfurius, J. T. Rasmussen, J. F. Keuren, T. Lindhout, R. F. Zwaal, and E. M. Bevers.** 2005. Activated scramblase and inhibited aminophospholipid translocase cause phosphatidylserine exposure in a distinct platelet fraction. *Cell Mol Life Sci* **62**:1514-1525.
163. **Wong, S. H., J. L. Barlow, S. Nabarro, P. G. Fallon, and A. N. McKenzie.** 2010. Tim-1 is induced on germinal centre B cells through B-cell receptor signalling but is not essential for the germinal centre response. *Immunology* **131**:77-88.
164. **Wu, N., J. Dai, and F. J. Mical.** 1999. Dynamic Surface Tension Measurement with a Dynamic Wilhelmy Plate Technique. *J Colloid Interface Sci* **215**:258-269.
165. **Wu, Q., L. Hu, P. Cai, Y. Li, F. Chen, and L. Kong.** 2009. Association analysis of TIM-1 -232G > A and 5383_5397 insertion/deletion polymorphisms with childhood asthma and total serum immunoglobulin E levels in middle China. *J Investig Allergol Clin Immunol* **19**:146-153.
166. **Wu, Q. W., P. C. Cai, L. Wang, Y. R. Li, L. L. Kong, and L. H. Hu.** 2009. Family-based association study of Tim-1 and Tim-3 gene polymorphisms with childhood asthma in Chinese trios. *Int Arch Allergy Immunol* **150**:252-260.
167. **Xiao, S., N. Najafian, J. Reddy, M. Albin, C. Zhu, E. Jensen, J. Imitola, T. Korn, A. C. Anderson, Z. Zhang, C. Gutierrez, T. Moll, R. A. Sobel, D. T. Umetsu, H. Yagita, H. Akiba, T. Strom, M. H. Sayegh, R. H. DeKruyff, S. J. Khoury, and V. K. Kuchroo.** 2007. Differential engagement of Tim-1 during activation can positively or negatively costimulate T cell expansion and effector function. *The Journal of experimental medicine* **204**:1691-1702.
168. **Yamaguchi, H., J. Takagi, T. Miyamae, S. Yokota, T. Fujimoto, S. Nakamura, S. Ohshima, T. Naka, and S. Nagata.** 2008. Milk fat globule EGF factor 8 in the serum of human patients of systemic lupus erythematosus. *Journal of leukocyte biology* **83**:1300-1307.
169. **Zasadzinski, J. A., R. Viswanathan, L. Madsen, J. Garnaes, and D. K. Schwartz.** 1994. Langmuir-Blodgett films. *Science* **263**:1726-1733.
170. **Zhang, G., V. Gurtu, S. R. Kain, and G. Yan.** 1997. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques* **23**:525-531.
171. **Zhao, H., and P. K. Kinnunen.** 2002. Binding of the antimicrobial peptide temporin L to liposomes assessed by Trp fluorescence. *The Journal of biological chemistry* **277**:25170-25177.
172. **Zhu, C., A. C. Anderson, A. Schubart, H. Xiong, J. Imitola, S. J. Khoury, X. X. Zheng, T. B. Strom, and V. K. Kuchroo.** 2005. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* **6**:1245-1252.

ANEXO I: PUBLICACIONES.

1. Portada revista Immunity volumen 26, número 3. Marzo 2007. Structure-Function of Tim receptors
2. Structures of T Cell Immunoglobulin Mucin receptors 1 and 2 reveal mechanisms for regulation of immune responses by the TIM receptor family.
3. Portada revista Immunity volumen 27, número 6. Diciembre 2007. TIM Glycoproteins Mediate Phagocytosis of Apoptotic Cells.
4. Structures of T Cell Immunoglobulin Mucin protein 4 show a Metal-Ion-Dependent Ligand Binding Site where phosphatidylserine binds.
5. T Cell/Transmembrane, Ig, and Mucin-3 allelic variants differentially recognize phosphatidylserine and mediate phagocytosis of apoptotic cells.

Immunity

An electron micrograph showing a cell in the process of phagocytosis. The cell is highlighted in yellow, and its internal organelles are visible. Two large, blue, electron-dense structures are visible within the cell, likely representing the phagosome or lysosome. The background shows the surrounding extracellular space and other cells.

Volume 27

Number 6

December 2007

www.cellpress.com

**TIM Glycoproteins Mediate
Phagocytosis of Apoptotic Cells**

Structures of T Cell Immunoglobulin Mucin Receptors 1 and 2 Reveal Mechanisms for Regulation of Immune Responses by the TIM Receptor Family

César Santiago,¹ Angela Ballesteros,¹ Cecilia Tami,² Laura Martínez-Muñoz,¹ Gerardo G. Kaplan,² and José M. Casasnovas^{1,*}

¹ Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Campus Universidad Autónoma, 28049 Madrid, Spain

² Center for Biologics Evaluation and Research, Food and Drug Administration, Bethesda, MD 20892, USA

*Correspondence: jcasasnovas@cnb.uam.es

DOI 10.1016/j.immuni.2007.01.014

SUMMARY

The T cell immunoglobulin mucin (TIM) receptors are involved in the regulation of immune responses, autoimmunity, and allergy. Structures of the N-terminal ligand binding domain of the murine mTIM-1 and mTIM-2 receptors revealed an immunoglobulin (Ig) fold, with four Cys residues bridging a distinctive CC' loop to the GFC β -sheet. The structures showed two ligand-recognition modes in the TIM family. The mTIM-1 structure identified a homophilic TIM-TIM adhesion interaction, whereas the mTIM-2 domain formed a dimer that prevented homophilic binding. Biochemical, mutational, and cell adhesion analyses confirmed the divergent ligand-binding modes revealed by the structures. Structural features characteristic of mTIM-1 appear conserved in human TIM-1, which also mediated homophilic interactions. The extracellular mucin domain enhanced binding through the Ig domain, modulating TIM receptor functions. These results explain the divergent immune functions described for the murine receptors and the role of TIM-1 as a cell adhesion receptor in renal regeneration and cancer.

INTRODUCTION

The genes coding for cellular receptors of the TIM family (also known as the Tim family) locate in an airway hyperactivity regulatory locus linked to asthma and allergy susceptibility in mice (McIntire et al., 2001). Up to eight genes have been described in mice and three in humans (Kuchroo et al., 2003), which code for at least four cellular receptors in mice (mTIM-1, mTIM-2, mTIM-3, and mTIM-4 [also known as Tim-1, Tim-2, Tim-3, and Tim-4]) and for three receptors in humans (TIM-1, TIM-3, and TIM-4). mTIM-2 is the only murine receptor that does not have a human ortholog.

The TIM receptors are type I cell-surface glycoproteins with an N-terminal Cys-rich region followed by a mucin domain at the extracellular region, a single transmembrane region, and a cytoplasmic tail with phosphorylation motifs except in the TIM-4 receptors. Sequence identity among the N-terminal Cys-rich region of TIM homologs is about 40%, whereas between the mouse and human orthologs, it is around 60%. There are, however, marked differences in the length of the threonine-, serine-, and proline-rich mucin domain, with the number of O-linked glycosylation sites ranging from 43 in mTIM-4 to 1 in TIM-3 (Kuchroo et al., 2003).

The TIM gene family is involved in the regulation of immune responses. mTIM-1 is preferentially expressed in Th2 cells and delivers a signal that enhances T cell activation and proliferation, increasing airway inflammation and allergy (Meyers et al., 2005; Umetsu et al., 2005). In contrast, mTIM-2 is an inhibitory molecule of Th2 immune responses (Chakravarti et al., 2005; Rennert et al., 2006). mTIM-3 is mainly expressed in Th1 cells and provides a negative costimulatory signal that leads to immune tolerance (Sabatos et al., 2003; Sanchez-Fueyo et al., 2003). Polymorphisms in mTIM-1 and mTIM-3 confer susceptibility to the development of asthma and allergy (McIntire et al., 2001).

Different ligands have been described for the murine members of the TIM family. mTIM-2 binds to Semaphorin 4A and H-ferritin (Kumanogoh et al., 2002; Chen et al., 2005). mTIM-4 expressed in antigen-presenting cells binds to mTIM-1 and triggers T cell proliferation, preventing development of antigen tolerance (Meyers et al., 2005). Similar phenotype was observed by crosslinking of mTIM-1 receptor molecules with the 3B3 mAb, which activated T cells and prevented the induction of respiratory tolerance (Umetsu et al., 2005). There is less information about the functions of the human TIM receptors. The *HAVCR1* gene that codes for TIM-1 was the first member of the TIM family identified initially in monkeys and subsequently in humans as the hepatitis A virus cellular receptor 1 (HAVCR1) (Kaplan et al., 1996; Feigelstock et al., 1998b). *HAVCR1* is an important asthma determinant gene in humans (McIntire et al., 2003), and its expression is up-regulated in acute kidney diseases and renal carcinoma

Table 1. Data Collection and Refinement Statistics

	Native mTIM-2	Se-Met mTIM-2	Native mTIM-1
Data Processing			
Space group	C2		P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell dimensions <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	61.5, 60.4, 69.1		44.5, 55.7, 75.5
α , β , γ (°)	90, 115.9, 90		90, 90, 90
Wavelength	0.9340	0.9330	1.0552
Resolution (Å)	25-1.5	25-2.0	25-2.5
<i>R</i> _{sym} or <i>R</i> _{merge}	7.4 (23.5)	5.0 (7.4)	8.4 (19.0)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	6.0 (3.0)	9.9 (9.1)	7.0 (4.0)
Completeness (%)	98.6 (99.6)	100 (100)	99.8 (100)
Redundancy	3.5 (2.9)	15.9 (14.4)	5.3 (5.5)
Refinement			
Resolution (Å)	15-1.5		15-2.5
No. reflections	35890		6839
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	19.2/20.8		23.2/27.8
No. atoms Protein	1710		1818
Ligand/Water	4/126		4/104
B-factors Protein	17(A)/23(B)		27(A)/22(B)
Ligand/Water	11/26		49/29
Rms deviations Bond lengths (Å)	0.0052		0.0078
Bond angles (°)	1.62		1.75

Diffraction data statistics at the highest resolution shell are shown in parentheses. B factors for the molecules A and B found in the asymmetric unit of the crystals are included.

(Han and Bonventre, 2004; Vila et al., 2004). The N-terminal Cys-rich domain is critical for binding of the TIM receptors to their ligands (Thompson et al., 1998; Sabatos et al., 2003; Sanchez-Fueyo et al., 2003; Meyers et al., 2005), and the mucin domain is required for binding of mTIM-1 to mTIM-4 (Meyers et al., 2005) and for the neutralization of HAV particles by TIM-1 (Silberstein et al., 2003).

Currently, there is no structural information on the TIM receptor domains, and it is unclear how they bind to their ligands. The predicted immunoglobulin fold for the N-terminal Cys-rich domain required further verification because of the unusually high number of conserved Cys residues (six) for a single Ig domain. We pursued structure determination of the Cys-rich region for several receptors and determined the crystal structures of the N-terminal domains of mTIM-1 and mTIM-2. Our work provides a structural view on ligand-binding domains in the TIM gene family. In spite of their high sequence identity (62%), these two receptors displayed striking differences in oligomerization and presentation of ligand-binding epitopes, which explain the reported divergence in ligand recognition. The structures and derived functional data defined two distinct ligand-recognition modes in the receptor family and identified a TIM-TIM intercellular interaction in mice and humans.

RESULTS

Structure of the N-Terminal Cys-Rich Domain of TIM Receptors

We used X-ray crystallography to determine the structure of the N-terminal Cys-rich domain of TIM family members. We obtained functional domains of the mTIM-1 and mTIM-2 receptors by using bacterial expression systems and raised crystals diffracting at high resolution (Experimental Procedures). The crystal structure of the N-terminal Cys-rich region of mTIM-2 was solved first at 1.5 Å resolution, and the mTIM-1 structure was subsequently determined to a resolution of 2.5 Å (Table 1). The structures revealed an Ig domain belonging to the V set (IgV), related to the N-terminal domains of the CD4 and CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor) cellular receptors (highest Z score in DALI search) (Holm and Sander, 1993). The IgV domains have two antiparallel β sheets with particularly short β strands B, E, and D in one face (BED β sheet) and the A, G, F, C, C', and C'' β strands in the opposite one (GFC β sheet) (Figures 1A and 1B). A Pro residue found prior to the first Cys in all TIM receptor domains was responsible for the short length of the β strand B (Figure 1D). The first and last Cys residues in the N-terminal domain of the TIM receptors bridged the

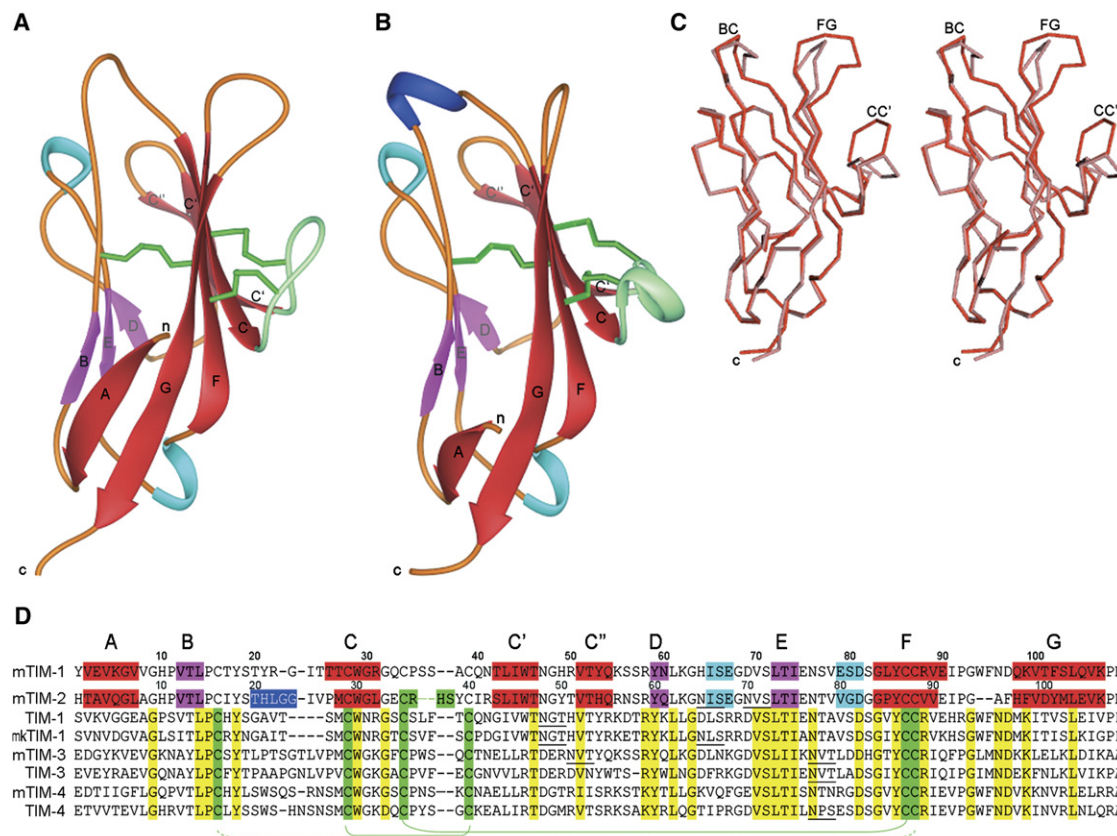


Figure 1. Crystal Structures of the N-Terminal Cys-Rich Domain of TIM Receptors

(A and B) Ribbon diagrams of the mTIM-1 and mTIM-2 structures are shown in (A) and (B), respectively. β strands of one face are red and those in the opposite side are magenta, coil is orange, 3_{10} helix is light blue, α helix in the BC loop is blue, and the loop between C and C' β strands is light green. Cys residues and disulphide bonds are in green. Strands are labeled with uppercase letters and terminal ends (n and c) are in lowercase. (C) Stereo view of superimposed mTIM-1 (red) and mTIM-2 (magenta) structures, with the regions showing structural variability labeled. (D) Structural alignment of the mTIM-1 and mTIM-2 structures with residues closer than 3 Å aligned. β strands and helical regions defined by the program dssp (Wolfgang and Sander, 1983) are colored as in (A) and (B). The other TIM receptor domains were aligned by sequence. Conserved residues in most TIM receptors are colored in yellow and the six Cys residues in green. N-linked glycosylation sites are underlined and sequences of mTIM-1 and mTIM-2 numbered. Green lines join the disulphide-linked Cys residues.

β sandwich as in most Ig domains, whereas the other four Cys residues characteristic of the TIM family formed two disulphide bonds that link a long CC' loop to the GFC β sheet (Figure 1).

The mTIM-1 and mTIM-2 N-terminal domains share 66% sequence identity and high structural similarity (Figure 1C). The rms deviation between the two structures was 0.9 Å, and the deviation between the two molecules in the asymmetric unit of the crystals was about 0.5 Å. The superimposed mTIM-1 and mTIM-2 structures showed just three misaligned regions (Figures 1C and 1D): the BC and FG loops and the interdisulphide region of the CC' loop. The mTIM-1 BC loop was one residue shorter than the mTIM-2 loop and it did not have a helical conformation. The extended and hydrophobic mTIM-1 FG loop structure is more representative of the family than that of mTIM-2 (Figure 1D).

The mTIM-1 and mTIM-2 structures defined a common architecture for the related N-terminal domains of TIM re-

ceptors, with structural variability circumscribed to the loops at the top of the domain. The two disulphide bonds on the GFC β sheet are a distinctive structural feature of TIM IgV domains.

CC' Loop Conformation Variability in the TIM and Related Ig Receptors

The interdisulphide region of the CC' loop was remarkably different in the homologous mouse receptors (Figure 1C). In mTIM-2, the tip of the loop folds down and had a helical conformation, whereas in mTIM-1 it extended up onto the GFC β sheet. These differences arise from distinct contacts between residues in the loop and the β sheet (Figure 2). In mTIM-2, the aromatic ring of Tyr39 was located on the top of the helical CC' loop and contacted the hydrophobic side chains of Val89 and Phe98, whereas the preceding residues projected toward the solvent (Figure 2A). The van der Waals interactions were not sufficient to fix the conformation of the interdisulphide region, so that

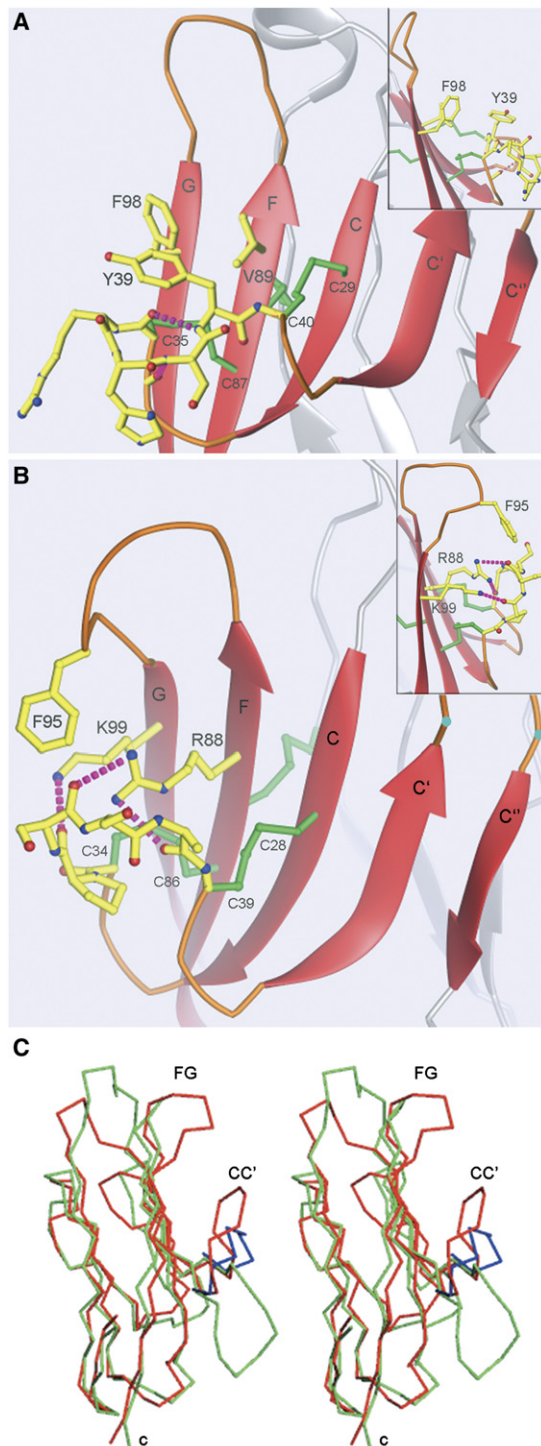


Figure 2. Conformation of the Loops Connecting C and C' β Strands in the TIM Structures and in Related IgV Domains (A and B) Ribbon diagram of the GFC face of the mTIM-2 (A) and mTIM-1 (B) domain structures. Insets show lateral views. Residues between the two external disulphide bonds in the CC' loop and interacting residues at the F and G β strands and at the FG loop are yellow. Hydrogen bonds are shown as pink dashed cylinders. Oxygens and nitrogen atoms are in red and blue, respectively. Residues are labeled according to Figure 1D. Blue dots on the C'C'' loop of (B) indicate

the tip of the solvent-exposed mTIM-2 CC' loop remained flexible and poorly defined in the electron density maps (not shown).

In mTIM-1, the conformation of the CC' loop tip was fixed by interactions with the Arg88 and Lys99 residues at the β strands F and G, respectively (Figure 2B). Their side chains hydrogen bonded to main-chain oxygen atoms of Pro35, Ser36, and Ala38 in the two molecules of the asymmetric unit. So, the disulphide-bridged CC' loop was additionally linked to the upper half of the β sheet by the conserved Arg88 and Lys99 residues in the mTIM-1 structure. These basic residues are conserved in all primate and murine TIM receptors, but they are absent in mTIM-2 (Figure 1D), which has a distinct CC' loop conformation from mTIM-1.

In addition to the described variations between the CC' loop of mTIM-1 and mTIM-2, there were also significant differences in the conformation of the neighboring FG loop (Figure 1C). The FG loop of mTIM-1 is extended by two additional aromatic residues, Trp94 and Phe95 (Figure 1D). The side chain of Phe95 came close ($\sim 4\text{\AA}$) to the tip of the CC' loop in the mTIM-1 structure (Figure 2B). Interestingly, the mTIM-1 FG loop is conserved in TIM-1 and in the human and mouse TIM-4 receptors, and the length of the loop in human TIM-3 and its mouse ortholog mTIM-3 is as in mTIM-1. The amino acid sequence similarities suggest that the conformational epitope built by the CC' and FG loops (CC'FG epitope) on the GFC face of the mTIM-1 domain could be conserved in the TIM receptor family, except for mTIM-2 (Figure 2A). Flexibility in the long FG loop could affect the epitope conformation.

The loops connecting the C and C' β strands are largely divergent both in length and conformation among V domains of Ig receptors (Tan et al., 2002). The CC' loop in the TIMs was seven residues longer than in the structurally related CD4 receptor (not shown), and it had similar length but different conformation than in the homologous CAR domain (Figure 2C). In CAR the CC' loop adopts an extended conformation, similar to other IgV domains where the GFC face is engaged in ligand recognition (Jones et al., 1992; Wang et al., 1999; van Raaij et al., 2000; Kostrewa et al., 2001), whereas in the TIM and CEA V domains, the loop folded back onto the β sheet (Figure 2C). In the CEA domain, the CC' loop packs against an aromatic residue on the C strand (Tan et al., 2002), whereas in the TIM receptors, it is bridged by two external disulphide bonds to the GFC β sheet.

The distinctive and protruding CC' loop onto the GFC face of the TIM IgV domains will prevent extended face-to-face intermolecular interaction through this side of the domain, observed with related Ig receptors (Jones et al., 1992; Wang et al., 1999; van Raaij et al., 2000; Kostrewa et al., 2001). Moreover, divergences on the CC' loop conformation

location of N-linked glycosylations in human and monkey TIM-1 and in mTIM-3.

(C) Stereo view of the superimposed mTIM-1 (red) and CAR (green, 1f5w) homologous domains. The CC' loop region of the CEA IgV domain (1L6Z) is blue.

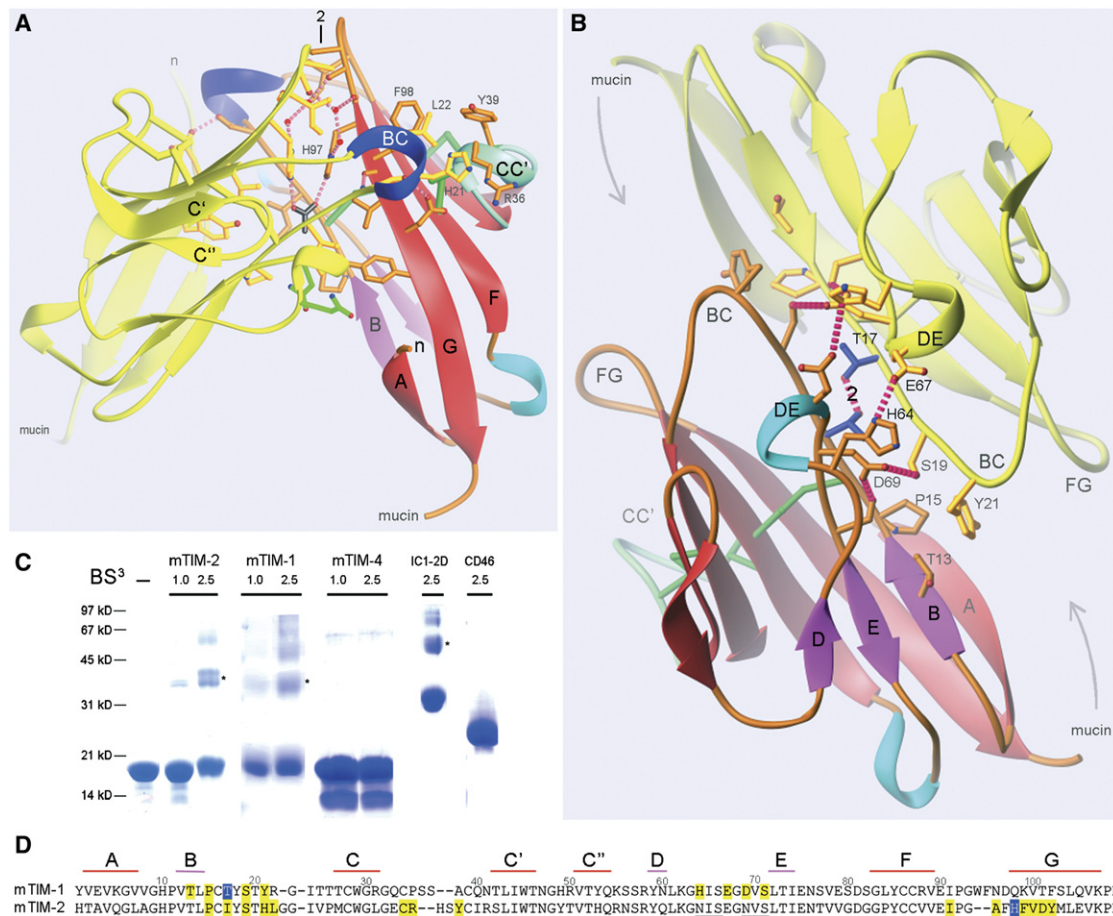


Figure 3. N-Terminal Domain Interactions in the TIM Receptors

(A and B) Ribbon diagrams of the two domains in the asymmetric unit of the mTIM-2 (A) and mTIM-1 (B) crystals. Side view of the dimer is displayed for mTIM-2, whereas a view along the quasi-2-fold axis (2) is shown for mTIM-1. Molecules presented in Figure 1 have the same coloring scheme, and the neighboring molecules are in yellow. Side chains of residues contributing to the dimer interfaces are included and some central residues are labeled. Acetate ligand found in the mTIM-2 structure is black, water molecules are red spheres, and hydrogen bonds are pink dashed cylinders. Asn residues to which glycans link in mTIM-2 are green. Arrows represent the hypothetical interaction of O-linked glycans from the C-terminal mucin domain with residues at the β strand A, BC, and FG loops of the interacting mTIM-1 domains (see also Figure S3).

(C) Self-association of the N-terminal IgV domains in solution. SDS-PAGE under reducing conditions of mTIM-1, mTIM-2, and mTIM-4 domains untreated (–) or treated with the indicated BS³ crosslinker concentration (mM). Treated ICAM-1 protein (IC1-2D) known to dimerize at high concentration and a soluble fragment of CD46 are also included. Size and migration of the molecular weight marker is indicated. Crosslinked dimers are labeled with an asterisk. No dimerization of the mTIM-4 IgV domain is seen here or in the protein crystals (not shown).

(D) Structural alignment with residues at the dimer interface in yellow and those at the center of the interacting molecules in blue. β strands are represented by lines.

such as that of mTIM-2 could lead to differences on ligand-binding specificity among receptors of the TIM family.

A Dimeric Structure for mTIM-2

Two mTIM-2 IgV domains built up the asymmetric unit of the crystals (Figure 3A). The angle between the two mTIM-2 domains was $\sim 60^\circ$ (Figure 3A), similar to intermolecular angles reported in structures showing dimerization in *cis* of receptors linked to the same cell surface (Casasnovas et al., 1998). The buried surface area by the domain association was of 775 Å² per monomer, close to that reported for antigen-antibody complexes (800 Å²) (Janin, 1997). Crosslinking experiments and analytical centrifuga-

tion revealed also self-association of the mTIM-2 IgV domains at high protein concentration in solution (Figure 3C and see Figure S1 in the Supplemental Data available online). Crosslinked dimers were observed with both mTIM-2 and mTIM-1 in conditions where dimerization was also detected for an ICAM-1 protein known to dimerize at high protein concentrations (Miller et al., 1995; Casasnovas et al., 1998). No such dimers were seen with the mTIM-4 IgV domain or a soluble CD46 receptor protein at the same protein concentration. Equilibrium sedimentation of the crystallized mTIM-2 protein (13 kDa) provided solution molecular weights of 16 and 21 kDa at low and high protein concentrations, respectively (Figure S1),

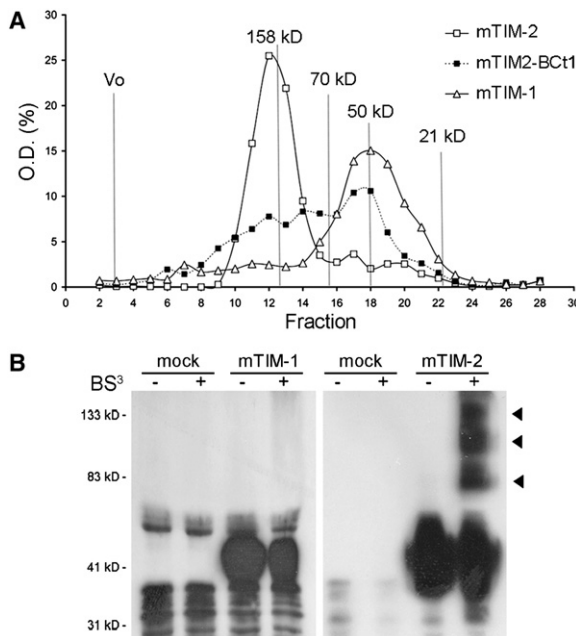


Figure 4. Oligomerization of the mTIM-2 Receptor

(A) Size exclusion chromatography of soluble mTIM-1 (open triangles) and mTIM-2 (open squares) molecules with the complete extracellular regions. mTIM2-BCt1 corresponds to a mutant mTIM-2 receptor where BC loop residues (HLG) were replaced by aligned residues in the mTIM-1 BC loop (YR). Percentage of the total optical density (OD) is plotted for each elution fraction. Exclusion volume and size of the molecular weight markers are indicated. A representative experiment is shown.

(B) Immunoblot of BS³ treated (+) or untreated (-) cell supernatants lacking (mock) or having the indicated TIM receptor (see [Experimental Procedures](#)). The arrows mark the three mTIM-2 oligomeric species. Size and migration of the molecular weight marker are shown.

indicating IgV domain oligomerization with increasing protein concentration. The determined dimerization K_D from sedimentation was $\sim 300 \mu\text{M}$.

The mTIM-2 molecule dimerized through the AB edge of the IgV domain, with the helical BC loop of one molecule embracing the G strand of the neighboring domain ([Figure 3A](#)). Main intermolecular contacts included residues following the β strand B, such as the conserved Pro15, the helical BC and CC' loops from the two interacting molecules, and residues on the FG loop and upper half of the β strand G ([Figure 3D](#)). The His97 residue that begins the β strand G was about the center of the dimer interface (labeled in [Figure 3A](#) and blue in [Figure 3D](#)). The hydrophobic cavity below the His97 side chain was occupied by an acetyl ligand, hydrogen bonded to the two neighboring histidine residues (black in [Figure 3A](#), see [Figure S2](#)), and a network of water molecules fill up the cavity over His97 ([Figure 3A](#)). Almost 50% of the total dimerization surface was buried by the helical BC loop (365 \AA^2) that sits on the β strand G and approached the CC' loop of the neighboring molecule ([Figure 3A](#)). The His21 side chain on the BC loop stacked over the long Arg36 side chain in the CC' loop, and the hydrophobic

Leu22 at the tip of the BC loop inserted into a hydrophobic pocket built by Cys35, Tyr39, and Phe98 ([Figure 3A](#)). Potential N-linked glycosylation sites lay below the interdomain interface and might contribute to the stability of the mTIM-2 dimer. Therefore, IgV domain dimerization creates an extended glycan-free surface at the top of the macromolecular complex highly accessible to ligands.

Interdomain Interactions in the mTIM-1

Crystal Structure

mTIM-1 IgV domain interactions were observed in the crystals and in solution, in contrast to the homologous mTIM-4 domain ([Figure 3](#) and [Figure S1](#)). The association of the two IgV domains in the asymmetric unit of the mTIM-1 crystals was remarkably different from mTIM-2. The mTIM-1 domains were related by a rotation angle of about 180° and had their C-terminal ends extending toward opposite directions ([Figure 3B](#)), which was suggestive of an intermolecular interaction between cell-surface receptors on opposite cell surfaces ([Wang et al., 1999](#)). The domains interact through the upper half of the BED face, including residues following the short β strand B and at the DE loop ([Figures 3B](#) and [3D](#)). Two Thr17 residues from opposite molecules were hydrogen bonded at the center of the dimer interface. Hydrophobic contacts included Thr13 and Pro15 with the bulky Tyr21 side chain at the BC loop of a neighboring domain. Additional interacting sites between the two mTIM-1 domains engaged several residues at the long DE coil ([Figures 3B](#) and [3D](#)). Asp69 bound to Ser19 on the BC loop of the opposite domain. Also, His64 and Glu67 were involved in interdomain interactions. Although these two residues at the helical DE loop are not conserved, some charged residues alternate at the aligned positions in the TIM receptors ([Figure 1D](#)). They could provide certain specificity for binding of TIM receptors *in trans*.

The interaction through the BED side of the mTIM-1 domains buried around 450 \AA^2 per monomer, significantly less than that observed for the mTIM-2 IgV domains. These differences correlated with the lower dimerization constant inferred from the sedimentation experiments, where a lower solution molecular weight was determined for the mTIM-1 IgV domain at high protein concentration ([Figure S1](#)). The buried surface was also lower than the 600 \AA^2 observed in intermolecular interactions between IgV domains of receptors binding through the GFC face ([Jones et al., 1992](#); [Wang et al., 1999](#); [Kostrewa et al., 2001](#)). Occupancy of a cavity between the β strand A, FG, and BC loop of the interacting domains could further stabilize the receptor interaction ([Figure S3](#)). In the crystals, the cavity was occupied by the C-terminal end of a symmetry-related domain. In the native mTIM-1 receptor, O-linked glycans from the contiguous mucin domain could penetrate in the interdomain cavity and bridge interacting receptors from opposite cells ([Figure 3B](#)). Potential glycan-interacting residues such as the basic Lys5 and Arg22, and the conserved Pro92, Trp94, and Asn96 on the FG loop lay on the upper edge of the cavity ([Figure S3](#)).

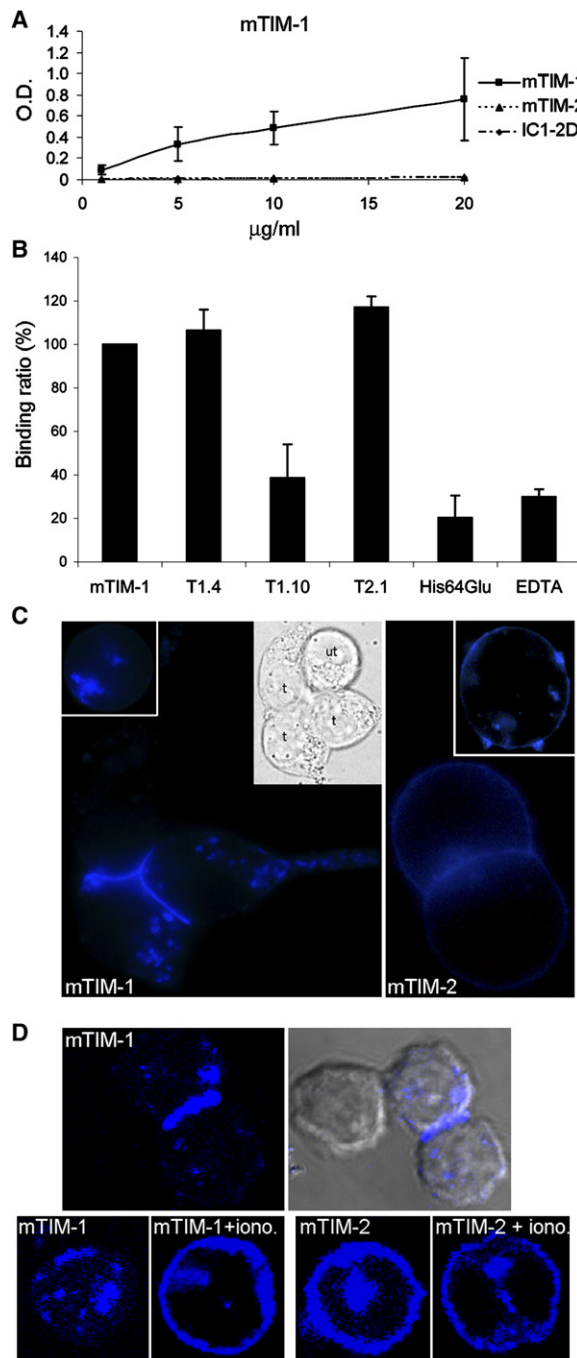


Figure 5. Homophilic mTIM-1 Receptor Interaction

(A) Binding of soluble Fc fusion proteins to plastic-coated mTIM-1 protein with the complete extracellular region. Binding to the isolated IgV domain is shown in Figure S4. TIM-Fc (mTIM-1 and mTIM-2) and control ICAM-1-Fc (IC1-2D) proteins used are included in the legend. Binding at the indicated protein concentration was determined from the optical density (OD) at 492 nm (see Experimental Procedures). Mean \pm SD of three experiments is shown.

(B) Normalized binding of mTIM-1-Fc protein to plastic-coated mTIM-1 IgV in the absence (mTIM-1) or presence of mTIM-1 (T1.4 and T1.10) and mTIM-2 (T2.1) antibodies, or EDTA (10 mM). Binding of a mutant mTIM-1-Fc protein where His64 was replaced by a glut-

Although intercellular binding of mTIM-1 to mTIM-4 has been described in the past (Meyers et al., 2005), the mTIM-1 structure provided an indication of homophilic binding in the TIM family.

mTIM-2 Receptor Oligomerization

To understand further the relevance of the mTIM-2 dimer structure and the organization of the mTIM-2 receptor on the cell surface, we analyzed oligomerization of the complete extracellular region (IgV and mucin domains) of the receptor molecule. Soluble mTIM-2 receptors secreted to cell supernatants were analyzed by size exclusion chromatography and chemical crosslinking (Figure 4). The mTIM-2 molecules eluted with an apparent molecular weight \sim 160 kDa (Figure 4A), whereas the size of the reduced protein was \sim 40 kDa (Figure 4B). In contrast, the exclusion size of the homologous mTIM-1 receptor molecule was similar to the size of the monomer. Replacement of BC loop residues (HLG, 25% of the buried surface) of mTIM-2 for the aligned residues of mTIM-1 (YR) reduced significantly (about 70%) the amount of mTIM-2 oligomer (Figure 4A), showing contribution of the BC loop to the mTIM-2 oligomerization revealed by the IgV domain structure. Oligomerization of the mTIM-2 receptors was confirmed by crosslinking experiments, where BS³-treated samples were analyzed by SDS-PAGE (Figure 4B). Because the experiment was done under nonsaturating crosslinker concentration, most of the receptor molecules migrated as monomer (40 kDa) in the denaturing gel. Heterogeneity related to O- and N-linked glycosylation could account for the broad bands of the soluble TIM proteins. Crosslinked mTIM-2 receptor oligomers that had molecular weights around 80, 120, and 150 kDa were seen in the BS³-treated mTIM-2 supernatants (arrows in Figure 4B). The intermediate oligomeric forms (80 and 120 kDa) could come from partial crosslinking of the high molecular weight tetrameric mTIM-2 molecule. Because the isolated N-terminal IgV domain of mTIM-2 dimerized in the crystals and in solution, it appears that the formation of the mTIM-2 receptor tetramer required the mucin domain. The absence of mTIM-1 oligomers suggested a divergence in the organization of the cellular receptors on the cell surface.

Homophilic mTIM-1 Receptor Interaction

To analyze the relevance of the TIM-TIM interaction showed by the mTIM-1 structure, we carried out both protein- and cell-binding assays (Figure 5). By using a protein-

mic acid (His64Glu) is also included. Mean \pm SD of 6 different measurements carried with 20 and 10 μ g/ml of Fc protein is shown.

(C) 293T cells transfected with the indicated TIM protein tagged with a cyan fluorescent protein (CFP) at their C-terminal ends. Fluorescence images of individual (white framed insets) and adhered cells were acquired 2 days after transfection (see Experimental Procedures). DIC image of the cell cluster with three transfected cells (t) and one cell untransfected (ut) or lacking mTIM-1 is shown in the inset.

(D) Fluorescence and DIC images of adhered 300.19 preB-cells transfected with CFP-tagged mTIM-1 are on the top. Individual transfected cells untreated or treated with 1 μ g/ml of ionomycin for 30 min at 37°C are in the bottom (see also Figure S4).

protein binding assay, we monitored binding of soluble mTIM-1-Fc fusion proteins with the IgV and mucin domains to plastic-coated mTIM-1 proteins having either the isolated IgV domain used in crystallization (Figure S4) or the complete extracellular region of the receptor (Figure 5A). mTIM-2-Fc fusion protein did not bind to either plastic-coated mTIM-1 (Figure 5A) or mTIM-2 proteins (not shown). Homophilic mTIM-1 binding was specifically blocked by the T1.10 mAb that recognizes the IgV domain and by the addition of EDTA (Figure 5B), which indicated requirement of divalent cations for high-affinity binding and suggested involvement of carbohydrates from the mucin domain. Interestingly, the structure-guided His64Glu mutation in the DE loop of the mTIM-1 IgV domain reduced significantly the homophilic mTIM-1 binding (Figure 5B), showing a critical contribution of the DE loop and agreement with the mTIM-1 structure (Figure 3B). This mutation decreased moderately (40%) binding of mTIM-1 to mTIM-4 (not shown), suggesting binding through the BED face as well. Determined affinity for the homophilic binding in the BIAcore was about 0.6 μ M (Figure S5), about 10^3 times higher than that inferred from sedimentation experiments with the isolated IgV domain. These differences showed requirement of the mucin domain and divalent cations for homophilic mTIM-1 binding, although preliminary observations indicated that the contribution of the mucin domain was more critical for mTIM-1 binding to mTIM-4 than for the homophilic interaction.

The involvement of the mTIM-1 and mTIM-2 receptors in cell-cell interactions was studied with receptor molecules that had a fluorescent protein tagged to their C-terminal intracellular domains (Figures 5C and 5D). mTIM-2 fluorescent proteins were on the surface of 293T and lymphoid cells, whereas most mTIM-1 accumulated at intracellular vesicles. However, treatment of the 300.19 lymphocytes with ionomycin or PMA enhanced localization of mTIM-1 on the cell surface (Figure 5D and Figure S4). mTIM-2 distributed quite homogeneously on the surface of both isolated and interacting cells, and additive fluorescence was seen at intercellular junctions. However, mTIM-1 redistributed to the intercellular junctions of transfected cells (Figures 5C and 5D). No increase in cellular receptor was observed at the junctions of transfected and untransfected cells.

Biochemical and cellular assays presented here showed a relevant homophilic intermolecular interaction for the mTIM-1 receptor at intercellular junctions, not seen with mTIM-2. The efficient trafficking of mTIM-2 to the cell surface could be related to its oligomeric nature, whereas productive transfer of mTIM-1 to the cell surface must require rearrangements in the receptor domains induced by increasing calcium concentration.

Conservation of the mTIM-1 Structure and the Homophilic Interaction in Humans

The conformation of the CC' and FG loops of mTIM-1 must be conserved in the human TIM-1 IgV domain. The Arg88 and Lys99 residues holding up the tip of the CC' loop in the structure are conserved in TIM-1 (Figures 1D and 2B).

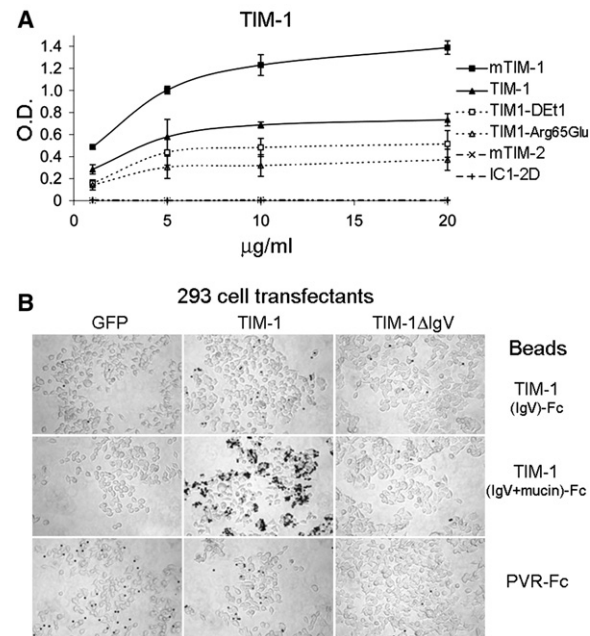


Figure 6. Homophilic TIM-1 Receptor Interaction in Humans
(A) Binding of soluble Fc fusion proteins to plastic-coated TIM-1 proteins with the complete extracellular receptor as in Figure 5A. Binding of the Arg65Glu TIM-1 mutant or a double mutant Asp62His-Arg65Glu (TIM1-DEt1) in the DE loop of the IgV domain are included.
(B) Binding of latex beads coated with the indicated protein to cells expressing GFP, the complete TIM-1 receptor, or a mutant lacking the IgV domain (TIM-1 Δ IgV).

Moreover, the sequence of the FG loop is conserved also in the human and mouse TIM-1 receptors.

The presumed structural similarity between the human and mouse TIM-1 IgV domains suggested conservation of the receptors functions. Therefore, homophilic TIM-1 binding was studied both with soluble and cell-surface-expressed receptor molecules. TIM-1-Fc proteins bound to TIM-1 molecules containing the complete extracellular portion of the receptor (Figure 6A). As shown with the murine receptor, mutations in the DE loop of the TIM-1 IgV domain affected the homophilic interaction, suggesting binding through the BED face as well. Interestingly, TIM-1 bound with lower affinity than mTIM-1. This could be related to residue substitutions at the interacting surfaces, such as the Tyr21 in mTIM-1 for Ala in the human receptor (Figure 1D), which will reduce hydrophobic contacts. Beads coated with the human TIM-1-Fc protein bound specifically to TIM-1 receptors expressed on the cell surface (Figure 6B). High-affinity binding required both IgV and mucin domains, as seen with mTIM-1.

HAV Binding to TIM-1 Receptors

HAV binds specifically to the N-terminal IgV domain of the human and monkey TIM-1 receptors (Kaplan et al., 1996; Feigelstock et al., 1998b), although no binding to mTIM-1 has been detected (unpublished results). The expected structural similarity between the primate and mouse N-terminal domains allowed us to define a virus-binding

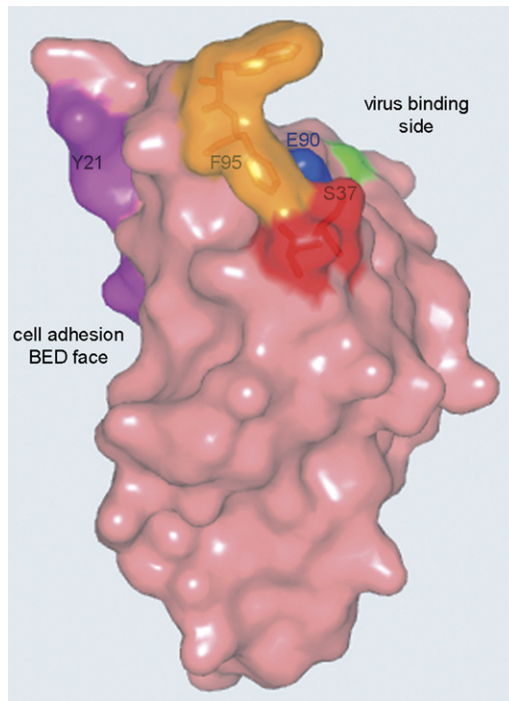


Figure 7. Ligand-Binding Surfaces in the IgV Domain of TIM-1 Receptors

Surface representation of the mTIM-1 domain structure. Surface involved in the homophilic interaction is pink. Residues in a conformational epitope built by the tip of the long CC' loop and the FG loop onto the GFC β sheet are colored red and orange, respectively. The surface where an mTIM-1 polymorphism (Lys88Gln) has been mapped is in blue. The mutation identified the side of the domain recognized by a mAb blocking HAV binding to its mTIM-1 receptor (Feigelsstock et al., 1998a). Surface corresponding to the Asn residue to which glycans will be linked in the primate TIM-1 receptors is green.

surface based on a gene polymorphism in monkey TIM-1 that abolished binding of a protective mAb (190/4) (Figure 7; Feigelsstock et al., 1998a). This antibody blocks HAV receptor binding and protects cells from infection. The antigenic variant Lys to Gln aligns with Glu90 in mTIM-1 (blue in Figure 7), nearby the CC'/FG epitope, and located the virus-binding surface on the GFC face of the IgV domain. A Glu residue is also found in human TIM-1, which binds to HAV but is not recognized by the 190/4 antibody. The protruding conformation of the CC'/FG epitope and its enhanced hydrophobicity in the primate TIM-1 receptors, which have aromatic residues both in the FG and CC' loops (Figure 1D), could be suited for HAV recognition. Moreover, the conservation of the FG loop in the primate and mouse TIM-1 IgV domains indicated that the enhanced hydrophobicity of the CC' loop in TIM-1 could determine its virus-binding specificity (Figure 1D). The unique Phe residue in the primate receptors at the Ser37 position of the mTIM-1 CC' loop (Figure 7) could in fact be a critical virus-binding residue, as described for a hydrophobic residue at the homologous loop in the CEA coronavirus receptor (Tan et al., 2002).

DISCUSSION

The crystal structures of the N-terminal ligand-binding domain of two TIM family members presented here have provided relevant insights for understanding the immune functions of these receptors. The structures of the related mTIM-1 and mTIM-2 showed marked differences in presentation of ligand-binding epitopes, suggestive of two distinct modes of ligand recognition. The lack of a human ortholog for mTIM-2 and the unique structural features of its IgV domain suggest an evolutionary divergence in mice and the conservation of mTIM-1-like structures in humans.

Dimerization of the N-terminal domain of mTIM-2 buries the domain surface engaged in homophilic mTIM-1 interactions, preventing mTIM-2 binding to mTIM-1 as well as homophilic mTIM-2 binding. Preliminary observations showed that disruption of the mTIM-2 dimer allowed binding to mTIM-1 (not shown). Oligomerization of the mTIM-2 receptor on the cell surface will facilitate binding to multivalent ligands (Kumanogoh et al., 2002; Chen et al., 2005). Differences on mTIM-1 and mTIM-2 organization on the cell surface could deliver distinct intracellular signals that lead to either activation or inhibition of Th2 immune responses, respectively.

The "extra" four Cys residues characteristic of the IgV domain in the TIMs fix the folded conformation of the long CC' loop onto the GFC β sheet, defining a distinctive structural feature of the TIM family. The conformation of the loop in mTIM-2 appears to be unique within the TIM family, whereas that of mTIM-1 could be shared by other TIM receptors. Conformation of the CC' loop in several mTIM-4 IgV domain crystal structures was almost identical to that described here for mTIM-1 (not shown). The CC' loop appears structurally connected to the FG loop in mTIM-1, building up a protruding CC'/FG epitope that partially covers the GFC β sheet. This feature suggests a divergence in ligand-recognition modes between the TIMs and related Ig receptors such as CAR, where a flat GFC face is engaged in intermolecular interactions (Jones et al., 1992; Wang et al., 1999; van Raaij et al., 2000; Kostrewa et al., 2001).

The crystal structure of mTIM-1 identified a new homophilic TIM-TIM receptor interaction in mice and humans that could be relevant for the regulation of immune functions by these receptors. Moreover, the observed trafficking of mTIM-1 to the cell surface upon lymphocyte stimulation revealed a new regulatory mechanism of TIM receptor functions. Engagement of mTIM-1 on the T cell surface by different ligands triggers a cell regulatory signal that has been linked to critical immune reactions (Meyers et al., 2005; Umetsu et al., 2005; Mesri et al., 2006). The observed clustering of mTIM-1 by homophilic binding at intercellular junctions could facilitate phosphorylation of its cytoplasmic tail, which provides a costimulatory signal for T cell activation (de Souza et al., 2005). Therefore, the homophilic mTIM-1-binding interaction described here could have important implications in the regulation of immune processes both in mice and humans and could be

responsible of the hyperproliferation of T cells observed in mice treated with soluble mTIM-1 molecules (Meyers et al., 2005). mTIM-1 is expressed on the surface of B cells and activated T cells (Meyers et al., 2005), so it is feasible that the homophilic mTIM-1 interaction mediates B-T cell adhesion interactions and has important implications in the regulation of immune responses. The conservation of the homophilic mTIM-1 receptor interaction both in mice and humans supports a conserved role in B-T cell cross-talk and its relevance in the immune system. Moreover, murine mTIM-1 and human TIM-1 receptors are overexpressed after ischemic kidney injury (Han and Bonventre, 2004), and human TIM-1 is overexpressed in renal carcinoma (Vila et al., 2004). The homophilic interaction described here suggests that TIM-1 could mediate cell adhesion interactions relevant for renal regeneration and tumor development. mTIM-1-related functions must be regulated also by receptor trafficking to the cell surface, which we show here is enhanced by increase of intracellular calcium amounts. This regulatory step could be shared by other receptors of the TIM family.

The homophilic mTIM-1 receptor binding pictured by the crystal structure revealed a striking difference with those mediated by related receptors. The IgV domains contact through their BED faces, opposite the GFC face commonly used for ligand binding by Ig receptors, which displayed a distinctive CC'FG epitope in mTIM-1. Although homophilic binding engaged the N-terminal IgV domain, experiments shown here suggested that carbohydrates from the contiguous mucin domain contribute to the interaction. O-linked glycans from the mucin domain could participate in TIM receptor interactions by occupying cavities generated upon N-terminal domain binding, such as that seen between the interacting mTIM-1 domains. Furthermore, polymorphisms in the mucin domain near the end of the IgV domain (McIntire et al., 2001) might have also some influence on the contribution of the O-linked glycans to the homophilic binding interactions, whereas those close to the membrane could modulate receptor oligomerization on the cell surface as well as intracellular receptor trafficking.

In summary, the crystal structures of the related murine mTIM-1 and mTIM-2 receptors presented here provided the structural basis for understanding ligand-binding diversity and the immune regulatory role of the TIM gene family. In contrast to the structural and functional redundancy observed in other receptor families (Wang and Springer, 1998), the structural divergence between the mTIM-1 and mTIM-2 receptors explains the marked differences in their ligand-binding specificities and functions. The lack of a human mTIM-2 ortholog suggests that mTIM-2-related functions in humans must be carried out by a cellular receptor from a related family. In contrast, sequence similarity in the mTIM-1 structural motifs between primate and murine TIM receptors suggests a conserved ligand-binding mode in the family, as well as possible homophilic TIM-TIM interactions with other TIM receptors. Conservation of the homophilic TIM-1 binding in mice and humans suggests a critical implication in the regula-

tion of immune responses, although further investigation is now needed to determine the biological significance of this adhesion process. Moreover, structural insights coming from glycosylated TIM receptor are required for understanding the precise role of glycosylation in ligand recognition. Research extending the current knowledge on this relevant receptor family will guide the design of small molecules capable of regulating their functions in the immune system, preventing development of asthma, autoimmune diseases, and hepatitis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Antibodies and cDNAs

TIM mAbs were obtained from eBioscience, Inc. The full-length cDNA coding for mTIM-1 was obtained from mouse EST #AA547594 derived from a Knowles Solter mouse 2-cell embryo cDNA library (IMAGE consortium, ATCC). The cDNA coding for full-length mTIM-2 was obtained from EST #AA509542 derived from a C57BL/6J mouse mammary gland cDNA library (IMAGE consortium, ATCC).

Protein Sample Preparation for Crystallization

Bacterial expression of the Cys-rich domains cloned into the unique NdeI and XhoI sites of the pET-27b vector (Novagen) gave insoluble inclusion bodies. However, soluble receptor domains were prepared by in vitro refolding of the inclusion bodies as described elsewhere (Jimenez et al., 2005). The mTIM-1 and mTIM-2 domains had an N-terminal Met and residues 20 to 130 and 129 of the precursor proteins, respectively (McIntire et al., 2001), a thrombin recognition site, and two protein tags included in the vector. The soluble proteins eluted from a Superdex-75 column (Amersham Biosciences) with the expected retention volume (15–20 kDa) and were recognized by the corresponding TIM monoclonal antibodies (not shown). The recombinant proteins were thrombin treated to release C-terminal tags and further purified by ion-exchange chromatography.

mTIM-1 and mTIM-2 Crystallization and Structure Determination

Crystals were initially raised with the mTIM-2 protein at 12 mg/ml by the hanging drop method and with a crystallization condition of 30% PEG-2000 methylether, 5% PEG-400, 0.2 M ammonium sulfate, 0.1 M sodium acetate (pH 4.6) and ~4% 1,2,3 heptanetriol. The mTIM-2 crystals belong to the monoclinic C2 space group, and they have two molecules in the asymmetric unit and 45% solvent content. Plate-like crystals were raised with the mTIM-1 protein domain by very similar crystallization conditions to those used for mTIM-2. The crystals belong to the orthorhombic P212121 space group and have two independent molecules in the asymmetric unit and about 37% solvent content. Details on structure determination are included in [Supplemental Data](#); diffraction data and refinement statistics are shown in [Table 1](#). The refined models contain all 116 amino acid residues of the mTIM-1 protein construct and all 115 amino acid residues of the crystallized mTIM-2 protein for molecule B, but the five N-terminal and the three C-terminal residues are missing for molecule A. The N-terminal residue of mTIM-1 in [Figure 1D](#) corresponds to Tyr4 in the Pdb file. The determined N-terminal His residue for the mammalian-expressed mTIM-2 receptor protein corresponds to His4 in the Pdb file.

Protein Expression in Mammalian Cells

DNAs coding for the complete extracellular region of the TIM receptors followed by a thrombin recognition site were cloned upstream of a hemagglutinin A epitope (TIM-HA) or the IgG1-Fc region (TIM-Fc) in the pEF-BOS expression vector (Jimenez et al., 2005). Serum-free cell supernatants with HA and Fc-tagged soluble receptor proteins were prepared by transient expression in 293T cells and protein concentration (10–50 µg/ml) determined by ELISA (Jimenez et al., 2005).

Mutagenesis was done by the overlapping PCR technique and confirmed by DNA sequencing. Fluorescent-tagged proteins at their cytoplasmic tails were expressed in 293T cells and in the murine 300.19 pre-B cell line by transfection with recombinant mTIM-1 and mTIM-2 cDNAs cloned in-frame with a cyan fluorescent variant of GFP (CFP) in the pECFP-N1 vector (Clontech). Cells were visualized with an Olympus IX81 confocal microscope. Confocal fluorescence and differential interference contrast (DIC) images were acquired and superimposed with the FV10-ASW 1.4 software. Fluorescent proteins were localized by excitation with a 405 nm line.

Receptor Oligomerization

Analysis of receptor oligomerization by size-exclusion chromatography was carried with TIM-HA proteins in serum-free media. Cell supernatants collected 1 day after 293T transfection with the pEF-TIM-HA construct were concentrated five times and run through a Superdex200 column with HBS buffer (20 mM HEPES and 100 mM NaCl [pH 7.5]) and 2.5 mM CaCl_2 . The proteins in the elution fractions were detected by ELISA with HA and TIM antibodies. Molecular weight markers were run under the same conditions. Analysis of TIM-HA oligomerization by chemical crosslinking was done by BS³ (Bis(sulfosuccinimidyl) suberate) (Pierce) treatment of the proteins in cell supernatants collected 3 days after transfection. After overnight treatment at 4°C, the reaction was quenched with 50 mM Tris (pH 7.5), and the proteins were immunoprecipitated with anti-HA mAb (12CA5) and protein A-Sepharose and resolved by 8% SDS-PAGE under reducing conditions. Proteins were detected by immunoblot with the HA antibody and the ECL detection system (Amersham Biosciences). Chemical crosslinking of the isolated TIM IgV domains and control proteins at 5 mg/ml was carried with BS³ for 1 hr at 4°C in HBS buffer. The samples were analyzed by 12% SDS-PAGE.

TIM-TIM Binding Assays

Binding of soluble Fc fusion proteins to plastic-coated IgV domain prepared in bacteria and TIM-1-HA proteins prepared in mammalian cells was carried in duplicate wells of 96-well plates as described elsewhere (Jimenez et al., 2005). Binding data were corrected by the background binding monitored in wells without coated proteins. A control ICAM-1-Fc (IC1-2D) protein was included in the experiments. Fc fusion proteins in cell supernatants supplemented with 5% FCS were diluted with binding buffer (20 mM Tris [pH 7.5], 100 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2 , and 5% FCS). Blocking antibodies were used at 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Protein A-purified TIM-1-Fc fusion proteins were covalently coupled to 6 micron blue carboxylated microparticles as recommended by the manufacturers (Polyscience, Inc.). The poliovirus receptor (PVR) protein was included as control. 293H cells transfected with the plasmids containing cDNAs for the indicated proteins were incubated with the beads 24–48 hr after transfection in PBS with 2% FCS at room temperature. After 15–30 min, unbound beads were washed and cell monolayers in culture media examined under an inverted microscope (200 \times) for micrograph acquisition.

Supplemental Data

Supplemental Data include five figures and Experimental Procedures and can be found with this article online at <http://www.immunity.com/cgi/content/full/26/3/11/DC1/>.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the European Synchrotron Radiation Facility for provision of synchrotron radiation facilities through the BAG-Madrid and to the BM16 beamline. We are thankful to A. Alcamí for providing a BIA-core instrument, to B. Souto and G. Nurani for mTIM-2 crystallization, to C. Alfonso for ultracentrifugation experiments and to S. Prat for comments. This work was supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (BIO2002-03281, BFU2005-05972) to J.M.C. and from the US National Institutes of Health (PO1 AI54456) and Food and Drug Administration to G.G.K. A grant from

the CAM-CSIC (200520M028) to J.M.C. is also acknowledged. This paper is dedicated to the memory of J. Tormo, who started protein crystallography at CNB.

Received: November 3, 2006

Revised: January 9, 2007

Accepted: January 29, 2007

Published online: March 15, 2007

REFERENCES

- Casasnovas, J.M., Stehle, T., Liu, J.-H., Wang, J.-H., and Springer, T.A. (1998). A dimeric crystal structure for the N-terminal two domains of intercellular adhesion molecule-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4134–4139.
- Chakravarti, S., Sabatos, C.A., Xiao, S., Illes, Z., Cha, E.K., Sobel, R.A., Zheng, X.X., Strom, T.B., and Kuchroo, V.K. (2005). Tim-2 regulates T helper type 2 responses and autoimmunity. *J. Exp. Med.* 202, 437–444.
- Chen, T.T., Li, L., Chung, D.H., Allen, C.D., Torti, S.V., Torti, F.M., Cyster, J.G., Chen, C.Y., Brodsky, F.M., Niemi, E.C., et al. (2005). TIM-2 is expressed on B cells and in liver and kidney and is a receptor for H-ferritin endocytosis. *J. Exp. Med.* 202, 955–965.
- de Souza, A.J., Oriss, T.B., O'Malley, K.J., Ray, A., and Kane, L.P. (2005). T cell Ig and mucin 1 (TIM-1) is expressed on in vivo-activated T cells and provides a costimulatory signal for T cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 17113–17118.
- Feigelsstock, D., Thompson, P., Mattoo, P., and Kaplan, G.G. (1998a). Polymorphisms of the hepatitis A virus cellular receptor 1 in African green monkey kidney cells result in antigenic variants that do not react with protective monoclonal antibody 190/4. *J. Virol.* 72, 6218–6222.
- Feigelsstock, D., Thompson, P., Mattoo, P., Zhang, Y., and Kaplan, G.G. (1998b). The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor. *J. Virol.* 72, 6621–6628.
- Han, W.K., and Bonventre, J.V. (2004). Biologic markers for the early detection of acute kidney injury. *Curr. Opin. Crit. Care* 10, 476–482.
- Holm, L., and Sander, C. (1993). Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J. Mol. Biol.* 233, 123–138.
- Janin, J. (1997). Specific versus non-specific contacts in protein crystals. *Nat. Struct. Biol.* 4, 973–974.
- Jimenez, D., Roda, P., Springer, T.A., and Casasnovas, J.M. (2005). Contribution of N-linked glycans to the conformation and function of intercellular adhesion molecules (ICAMs). *J. Biol. Chem.* 280, 5854–5861.
- Jones, E.Y., Davis, S.J., Williams, A.F., Harlos, K., and Stuart, D.I. (1992). Crystal structure at 2.8 Å resolution of a soluble form of the cell adhesion molecule CD2. *Nature* 360, 232–239.
- Kaplan, G., Totsuka, A., Thompson, P., Akatsuka, T., Moritsugu, Y., and Feinstone, S.M. (1996). Identification of a surface glycoprotein on african green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *EMBO J.* 15, 4282–4296.
- Kostrewa, D., Brockhaus, M., D'Arcy, A., Dale, G.E., Nelboeck, P., Schmid, G., Mueller, F., Bazzoni, G., Dejana, E., Bartfai, T., et al. (2001). X-ray structure of junctional adhesion molecule: structural basis for homophilic adhesion via a novel dimerization motif. *EMBO J.* 20, 4391–4398.
- Kuchroo, V.K., Umetsu, D.T., DeKruyff, R.H., and Freeman, G.J. (2003). The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 454–462.
- Kumanogoh, A., Marukawa, S., Suzuki, K., Takegahara, N., Watanabe, C., Ch'ng, E., Ishida, I., Fujimura, H., Sakoda, S., Yoshida, K., and Kikutani, H. (2002). Class IV semaphorin Sema4A enhances T-cell activation and interacts with Tim-2. *Nature* 419, 629–633.
- McIntire, J.J., Umetsu, S.E., Akbari, O., Potter, M., Kuchroo, V.K., Barsh, G.S., Freeman, G.J., Umetsu, D.T., and DeKruyff, R.H. (2001).

Identification of *Tapr* (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked *Tim* gene family. *Nat. Immunol.* 2, 1109–1116.

McIntire, J.J., Umetsu, S.E., Macaubas, C., Hoyte, E.G., Cinniglu, C., Cavalli-Sforza, L.L., Barsh, G.S., Hallmayer, J.F., Underhill, P.A., Risch, N.J., et al. (2003). Hepatitis A virus link to atopic disease. *Nature* 425, 576.

Mesri, M., Smithson, G., Ghatpande, A., Chapoval, A., Shenoy, S., Boldog, F., Hackett, C., Pena, C.E., Burgess, C., Bendele, A., et al. (2006). Inhibition of in vitro and in vivo T cell responses by recombinant human Tim-1 extracellular domain proteins. *Int. Immunol.* 18, 473–484.

Meyers, J.H., Chakravarti, S., Schlesinger, D., Illes, Z., Waldner, H., Umetsu, S.E., Kenny, J., Zheng, X.X., Umetsu, D.T., DeKruyff, R.H., et al. (2005). TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1-TIM-4 interaction regulates T cell proliferation. *Nat. Immunol.* 6, 455–464.

Miller, J., Knorr, R., Ferrone, M., Houdei, R., Carron, C.P., and Dustin, M.L. (1995). Intercellular adhesion molecule-1 dimerization and its consequences for adhesion mediated by lymphocyte function associated-1. *J. Exp. Med.* 182, 1231–1241.

Rennert, P.D., Ichimura, T., Sizing, I.D., Bailly, V., Li, Z., Rennard, R., McCoon, P., Pablo, L., Miklasz, S., Tarilonte, L., and Bonventre, J.V. (2006). T cell, Ig domain, mucin domain-2 gene-deficient mice reveal a novel mechanism for the regulation of Th2 immune responses and airway inflammation. *J. Immunol.* 177, 4311–4321.

Sabatos, C.A., Chakravarti, S., Cha, E., Schubart, A., Sanchez-Fueyo, A., Zheng, X.X., Coyle, A.J., Strom, T.B., Freeman, G.J., and Kuchroo, V.K. (2003). Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nat. Immunol.* 4, 1102–1110.

Sanchez-Fueyo, A., Tian, J., Picarella, D., Domenig, C., Zheng, X.X., Sabatos, C.A., Manlongat, N., Bender, O., Kamradt, T., Kuchroo, V.K., et al. (2003). Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nat. Immunol.* 4, 1093–1101.

Silberstein, E., Xing, L., van de Beek, W., Lu, J., Cheng, H., and Kaplan, G.G. (2003). Alteration of hepatitis A virus (HAV) particles by a soluble

form of HAV cellular receptor 1 containing the immunoglobulin-and mucin-like regions. *J. Virol.* 77, 8765–8774.

Tan, K., Zelus, B.D., Meijers, R., Liu, J.-h., Bergelson, J.M., Duke, N., Zhang, R., Joachimiak, A., Holmes, K.V., and Wang, J.-h. (2002). Crystal structure of murine sCEACAM1a[1,4]:a coronavirus receptor in the CEA family. *EMBO J.* 21, 2076–2086.

Thompson, P., Lu, J., and Kaplan, G.G. (1998). The Cys-rich region of hepatitis A virus cellular receptor 1 is required for binding of hepatitis A virus and protective monoclonal antibody 190/4. *J. Virol.* 72, 3751–3761.

Umetsu, S.E., Lee, W.L., McIntire, J.J., Downey, L., Sanjanwala, B., Akbari, O., Berry, G.J., Nagumo, H., Freeman, G.J., Umetsu, D.T., and DeKruyff, R.H. (2005). TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. *Nat. Immunol.* 6, 447–454.

van Raaij, M.J., Chouin, E., van der Zandt, H., Bergelson, J.M., and Cusack, S. (2000). Dimeric structure of the coxsackievirus and adenovirus receptor D1 domain at 1.7 Å resolution. *Structure* 8, 1147–1155.

Vila, M.R., Kaplan, G.G., Feigelsstock, D., Nadal, M., Morote, J., Porta, R., Bellmunt, J., and Meseguer, A. (2004). Hepatitis A virus receptor blocks cell differentiation and is overexpressed in clear cell renal cell carcinoma. *Kidney Int.* 65, 1761–1773.

Wang, J., and Springer, T.A. (1998). Structural specializations of immunoglobulin superfamily members for adhesion to integrins and viruses. *Immunol. Rev.* 163, 197–215.

Wang, J.-h., Smolyar, A., Tan, K., Liu, J.-h., Kim, M., Sun, Z.-Y., Wagner, G., and Reinherz, E.L. (1999). Structure of a heterophilic adhesion complex between the human CD2 and CD58 (LFA-3) Counterreceptors. *Cell* 97, 791–803.

Wolfgang, K., and Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22, 2577–2637.

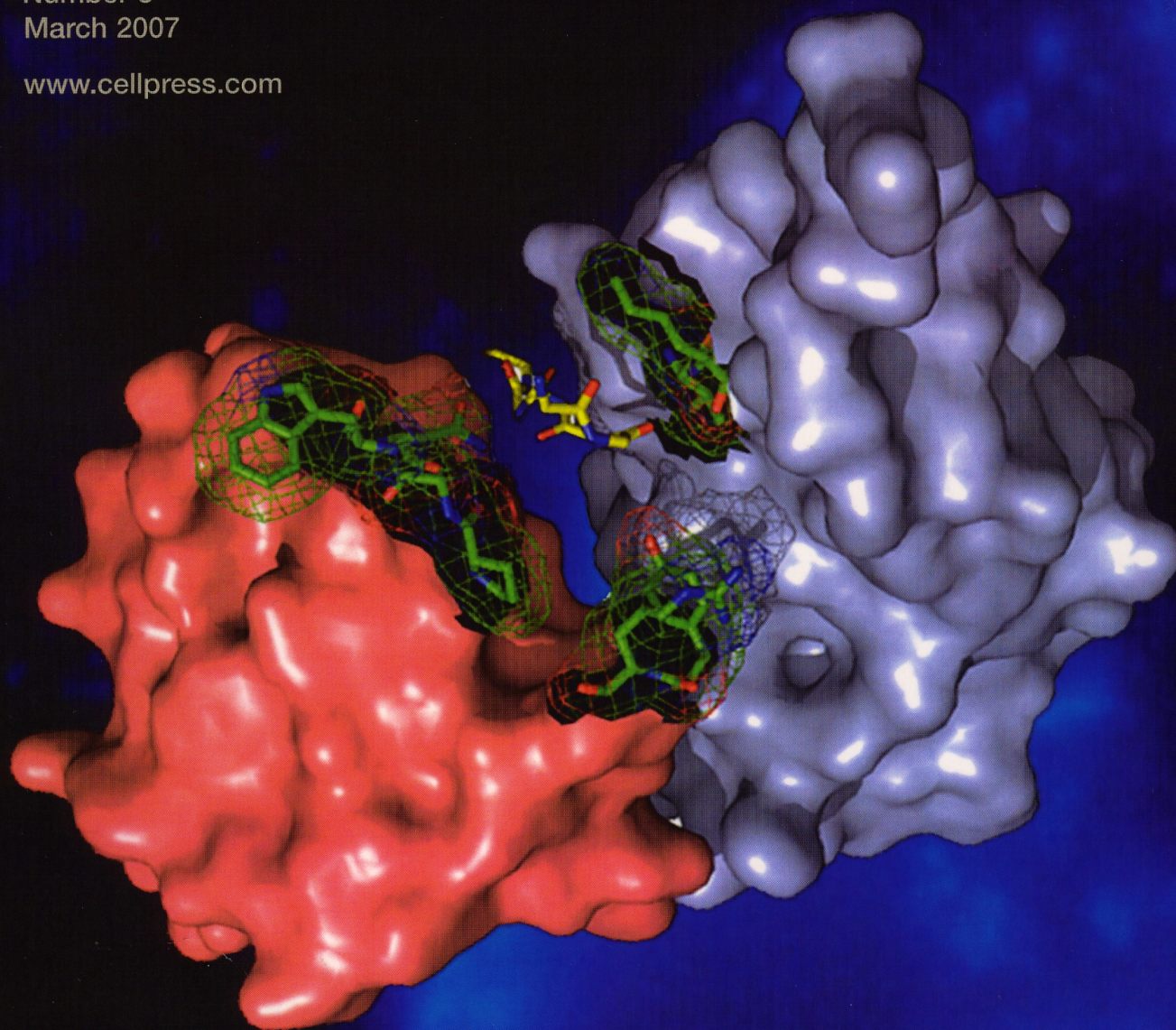
Accession Numbers

mTIM-1 and mTIM-2 coordinates have been deposited in the Protein Data Bank with access codes 2OR8 and 2OR7, respectively.

Immunity

Volume 26
Number 3
March 2007

www.cellpress.com



**Structure–Function
of Tim Receptors**

Structures of T Cell Immunoglobulin Mucin Protein 4 Show a Metal-Ion-Dependent Ligand Binding Site where Phosphatidylserine Binds

César Santiago,¹ Angela Ballesteros,¹ Laura Martínez-Muñoz,¹ Mario Mellado,¹ Gerardo G. Kaplan,² Gordon J. Freeman,³ and José M. Casasnovas^{1,*}

¹Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Campus Universidad Autónoma, 28049 Madrid, Spain

²Center for Biologics Evaluation and Research, Food and Drug Administration, Bethesda, MD 20892, USA

³Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

*Correspondence: jcasasnovas@cnb.uam.es

DOI 10.1016/j.immuni.2007.11.008

SUMMARY

The T cell immunoglobulin and mucin domain (TIM) proteins are important regulators of T cell responses. Crystal structures of the murine TIM-4 identified a metal-ion-dependent ligand binding site (MILIBS) in the immunoglobulin (Ig) domain of the TIM family. The characteristic CC' loop of the TIM domain and the hydrophobic FG loop shaped a narrow cavity where acidic compounds penetrate and coordinate to a metal ion bound to conserved residues in the TIM proteins. The structure of phosphatidylserine bound to the Ig domain showed that the hydrophilic head penetrates into the MILIBS and coordinates with the metal ion, whereas the aromatic residues on the tip of the FG loop interacted with the fatty acid chains and could insert into the lipid bilayer. Our results also revealed an important role of the MILIBS in the trafficking of TIM-1 to the cell surface.

INTRODUCTION

The TIM family is involved in the regulation of immune responses by modulating effector Th1 and Th2 cell functions (Kuchroo et al., 2006). Whereas TIM-1 and TIM-2 are found in Th2 cells, TIM-3 is preferentially expressed in Th1 cells. TIM-4 has been detected in antigen-presenting cells and may function as a natural ligand of TIM-1 (Meyers et al., 2005). Crosslinking of murine TIM-1 (mTIM-1) on the cell surface enhanced T cell activation and proliferation (Meyers et al., 2005; Umetsu et al., 2005). Diverging from mTIM-1, mTIM-2 inhibits Th2 responses (Chakravarti et al., 2005; Rennert et al., 2006) and binds to heterologous ligands such as semaphorin 4A and ferritin H (Chen et al., 2005; Kumanogoh et al., 2002). mTIM-3 provides a negative costimulatory signal that leads to immune tolerance (Sabatos et al., 2003; Sanchez-Fueyo et al., 2003), whereas binding of mTIM-3 to galectin-9 triggers Th1

apoptosis and the inhibition of Th1 responses (Zhu et al., 2005).

The TIM family has been associated with immune-related diseases, cancer, and viral infections. TIM-1 has been usurped by the hepatitis A virus (HAV) for cell entry in monkeys and humans (Feigelstock et al., 1998; Kaplan et al., 1996). *HAVCR1/TIM-1* is an important asthma-determinant gene in humans (McIntire et al., 2003), and its expression is upregulated in acute kidney diseases and renal carcinoma (Han and Bonventre, 2004; Vila et al., 2004). The TIM gene family is located in a genomic locus linked to autoimmune diseases and asthma both in mouse and humans (Kuchroo et al., 2006). These genes were linked to an airway hyperreactivity regulatory locus, and certain genetic variants of mTIM-1 and mTIM-3 were associated with the development of asthma in mouse models (McIntire et al., 2001).

The TIM proteins are type I membrane proteins with an N-terminal immunoglobulin (Ig) domain followed by a heavily glycosylated mucin domain in the extracellular region, a single transmembrane region, and a cytoplasmic tail with a tyrosine phosphorylation motif except in the human and mouse TIM-4, which have shorter cytoplasmic regions and lack the membrane-distal tyrosine that becomes phosphorylated in other TIM proteins (Kuchroo et al., 2006). Whereas sequence identity among the Ig domains is high (40%–60%), there are large differences in the length of the mucin domains (Kuchroo et al., 2003). Crystal structures of the Ig domains of mTIM-1, mTIM-2, and mTIM-3 revealed an Ig fold belonging to the V set (Cao et al., 2007; Santiago et al., 2007). A folded CC' loop disulphide linked to the GFC β sheet by four Cys residues characteristic of the TIM proteins is a distinctive structural feature of the IgV domain in the family. This loop appeared structurally connected to the FG loop in the mTIM-1 and mTIM-3 structures, building up a CC'FG epitope onto the GFC β sheet (Cao et al., 2007; Santiago et al., 2007). In contrast, in mTIM-2, the CC' and FG loops have a distinct conformation, so that the domain lacks the structural epitope (Santiago et al., 2007). The structures provided insights on ligand recognition by the TIM family. The HAV virus and an unidentified mTIM-3 ligand appear

Table 1. Data Collection and Refinement Statistics

	mTIM-4 (X1)	mTIM-4 (X2)	mTIM-4 (X3)
Data Processing			
Space group	P321	P6 ₃ 22	P6 ₃ 22
Cell dimensions			
a, b, c (Å)	65.3, 65.3, 57.0	67.8, 67.8, 129.1	66.3, 66.3, 139.4
α, β, γ (°)	90, 90, 120	90, 90, 120	90, 90, 120
Wavelength	0.9310	0.9310	0.9793
Resolution (Å)	25-2.95	25-2.2	25-2.5
R _{sym} or R _{merge}	10.9 (27.2)	5.7 (21.1)	5.7 (16.8)
I/σI	6.7 (2.8)	10.5 (3.6)	9.3 (4.4)
Completeness (%)	98.3 (98.3)	99.9 (99.9)	99.9 (100)
Redundancy	5.2 (4.0)	20.2 (19.3)	11.0 (10.2)
Refinement			
Resolution (Å)	15-2.95	15-2.2	15-2.5
No. reflections	3036	9009	6421
R _{work} /R _{free}	23.6/26.8	21.8/23.8	21.9/24.8
No. atoms			
Protein	893	864	855
Ligand/ion/water	12/0/11	10/1/80	26/1/47
B factors			
Protein	27	25	36
Ligand/ion/water	12/-/18	16/15/29	45/34/38
Rms deviations			
Bond lengths (Å)	0.008	0.008	0.008
Bond angles (°)	1.763	1.110	1.114

Statistics of the three crystal structures (X1, X2, and X3) solved for the mTIM-4 IgV domain.

Diffraction data statistics at the highest resolution shell are shown in parentheses.

Ligands included were acetate (X1), tartrate (X2), or Dicaproyl-PS (X3). A sodium ion was modeled in the X2 and X3 structures.

to bind to the GFC face of the IgV domain (Cao et al., 2007; Santiago et al., 2007), whereas the opposite BED face was used in intercellular interactions among receptors of the TIM family (Santiago et al., 2007). Even though homophilic TIM-1 binding and homotypic TIM-TIM receptor interactions engaged the N-terminal IgV domains, high-affinity binding of TIM-1 to either TIM-1 or TIM-4 required the mucin domains (Meyers et al., 2005; Santiago et al., 2007). It has been proposed that TIM-TIM receptor binding required a combinatorial epitope built by the IgV and mucin domains (Wilker et al., 2007). Both domains were also needed for efficient neutralization of HAV by soluble monkey TIM-1 (Silberstein et al., 2003).

Crystal structures of the mTIM-4 IgV domain presented here identified a distinctive ligand binding pocket with a metal ion coordination site. The physiological ligand phosphatidylserine (see accompanying paper from Kobayashi et al., 2007, in this issue of *Immunity*) bound into the cavity and coordinated to the metal. Mutation of protein residues engaged in metal ion coordination or building

up the binding pocket in the IgV domain affected TIM functions and showed the relevance of this site for ligand recognition.

RESULTS

The Crystal Structure of the N-Terminal IgV Domain of mTIM-4

The isolated N-terminal domain of mTIM-4 was obtained essentially as described for the homologous mTIM-1 and mTIM-2 domains (Santiago et al., 2007). An initial crystal form (X1) diffracting at about 3 Å resolution was prepared with the crystallization conditions used for mTIM-1 (Experimental Procedures and Table 1). The crystal structure was solved by the molecular replacement method (see Experimental Procedures). The IgV domain had substantially longer β strands in the GFC than in the BED β sheet (Figure 1A). The long CC' loop folded back onto the GFC β sheet as in the structures of the homologous TIM domains (Cao et al., 2007; Santiago et al.,

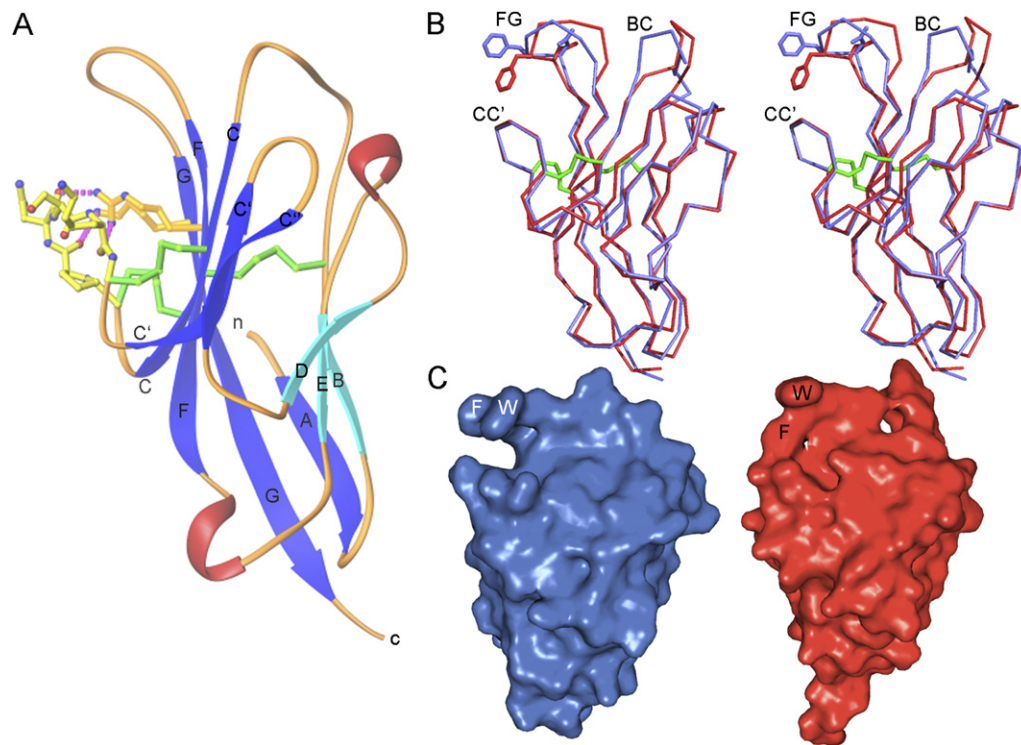


Figure 1. Crystal Structure of the N-Terminal Domain of mTIM-4 and Conformation of the CC'FG Loop Epitope

(A) Ribbon diagram of the mTIM-4 IgV domain structure (X1 in Table 1). β strands are labeled with uppercase letters whereas N- and C-terminal ends are in lowercase. Cys residues and disulphide bonds are shown in green. The tip of the peculiar CC' loop is shown in yellow with a ball-and-stick representation and with the oxygens in red and the nitrogens in blue. The Arg and Lys residues bridging the tip of the CC' loop to the F and G β strands are orange. Hydrogen bonds are shown as shaded pink cylinders.

(B) Stereo view of the superimposed N-terminal IgV domains of mTIM-1 (red) and mTIM-4 (blue) structures crystallized under similar conditions. The side chains of the conserved Phe and Asn residues having distinct conformation in the FG loop of the structures are included. BC, CC', and FG loops are labelled.

(C) Surface representation of the structures. CC' and FG loops appeared connected in mTIM-1 (red), whereas they are disconnected in mTIM-4 (blue), where a narrow cavity appears. Phe and Trp residues in the tip of the FG loop are labeled.

2007). The bottom of the loop was bridged to the β sheet by two disulphide bonds, whereas the tip was hydrogen bonded to the conserved Arg and Lys residue on F and G β strand, respectively (Figure 1A). The interactions of the tip of the loop with the basic residues were also observed in the mTIM-1 and mTIM-3 structures and they were absent in mTIM-2 (Cao et al., 2007; Santiago et al., 2007). Therefore, the conformation of the CC' loop in the mTIM-4 IgV domain structure was identical to that in mTIM-1 (Figure 1B), whereas some structural variability was observed in the BC and FG loops.

In the mTIM-1 structure, the CC' and FG loops were connected by a Phe residue that is conserved in the FG loop of the mTIM-4 IgV domain (Figures 1B and 1C). Hydrophobic residues also joined the loops in the mTIM-3 domain (Cao et al., 2007). However, the loops appeared disconnected in the mTIM-4 structure because of a conformational switch in the Phe side chain, which was distant from the CC' loop. The conformation of the Asn residue conserved in the FG loop of the TIM proteins was also switched (Figure 1B). A narrow cavity built by the tip of the CC' loop and the interacting basic residue

at the bottom and the aromatic Trp and Phe residues at the top of the FG loop was revealed by a surface representation of the mTIM-4 IgV domain structure (Figure 1C). Some electron density was observed inside the cavity, which could come from either an alternate conformation of the Phe residue or a bound compound from the crystallization buffer. Thus, the structure of the X1 crystal form of mTIM-4 revealed a distinct conformation for the CC'FG loop epitope from that shown by the mTIM-1 structure, but the relevance of those changes was unclear.

A Metal Ion Coordination Site in the FG Loop of the mTIM-4 IgV Domain

To get further insights on the conformation of the CC'FG epitope in the TIM IgV domains from crystal structures, we searched for new crystal forms with both the mTIM-1 and the mTIM-4 proteins. Crystals diffracting at 2.2 Å resolution were prepared with the mTIM-4 IgV domain and with potassium sodium tartrate as precipitant (X2 in Table 1). The structure was almost identical to that of the X1 crystals (see Figure S1 available online). The Phe residue on the FG loop pointed away from the CC' loop, so that

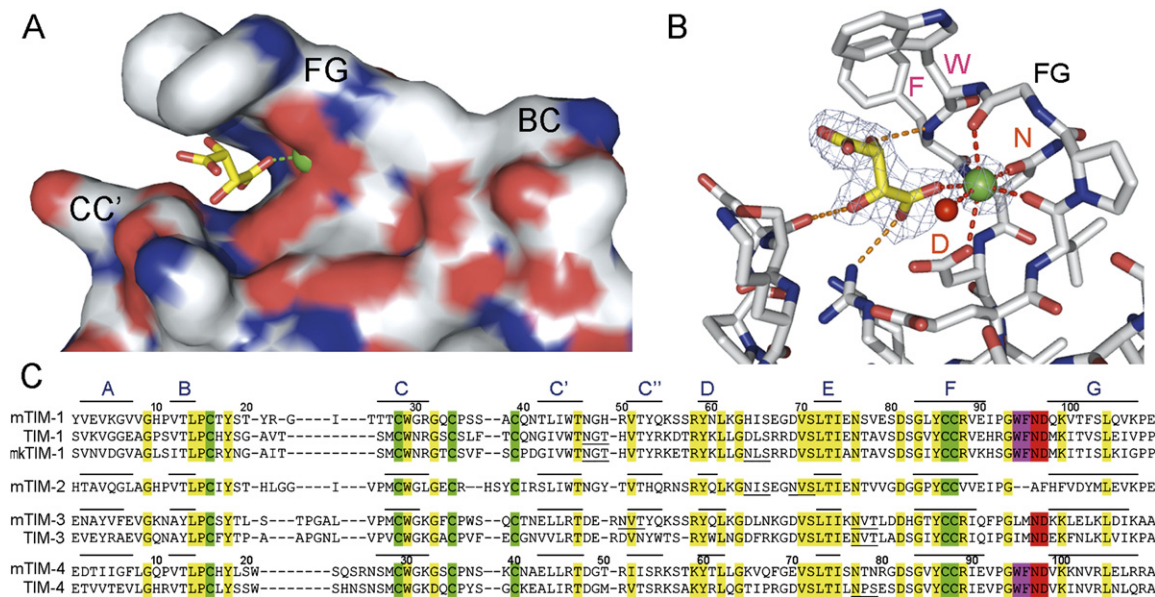


Figure 2. A Metal Ion Coordination Site in the mTIM-4 IgV Domain

(A) Surface representation of the top region of the IgV domain structure determined in the presence of tartrate (X2 in Table 1). The tartrate inside of the cavity built by the CC' and FG loops is shown with stick representation and with the carbons in yellow and the oxygens in red. The sodium ion to which the tartrate coordinates is shown as a green sphere. In the protein, the oxygens are red, nitrogens blue, and carbons gray. Loops are labeled.

(B) Detailed view of the metal ion coordinated to the tartrate, to the main chain and side chain oxygens of FG loop residues, and to a water molecule (red sphere). Electron Fo-Fc density map shown as a light blue mesh and contoured at 4 σ was determined omitting both tartrate and metal ion. Coordinations are shown as dashed red lines, whereas hydrogen bonds are orange. Atoms are colored as in (A). The structure defined a metal-ion-dependent ligand binding site (MILIBS).

(C) Structural alignment of the murine mTIM-1 (2OR8), mTIM-2 (2OR7), mTIM-3 (2OYP), and mTIM-4 IgV domain structures with residues closer than 3 Å aligned. β strands are shown with lines. The human and monkey (mk) TIM proteins were aligned by sequence. Conserved residues in most domains are colored in yellow and the six Cys residues are in green. N-linked glycosylation sites are underlined and sequences of mTIM-1 and mTIM-4 are numbered. Residues coordinating the cation in the mTIM-4 structure are red, while the aromatic residues at the tip of the FG loop building the binding pocket are magenta. Labeled in (B).

both loops were disconnected (Figure 2A). The high resolution of the structure allowed the identification of an electron density filling up the cavity as a tartrate present at high concentration in the crystallization conditions. The tartrate lay below the Trp residue of the FG loop and was hydrogen bonded to several protein residues (Figure 2B). A second electron density near the carboxylate group of the tartrate was identified as a sodium or calcium metal ion by the WaSP program (Nayal and Cera, 1996). The metal ion was coordinated to the tartrate, to two main chain and two side chain oxygens of an Asn and Asp residues in the FG loop, and to a water molecule (Figure 2B). The coordination number (6) and the average coordination distance (2.5 Å) are usual for both sodium and calcium ions, whereas the distances to potassium are more than 2.7 Å (Harding, 2002). A sodium ion was modeled because of the lack of calcium in the crystallization conditions and the lower B factor obtained with sodium in the structure refinement. Temperature B factor for potassium was similar to that obtained with calcium (28) and higher than that of the refined sodium ion (15), which was close to the tartrate B factor (Table 1).

The Asn and Asp protein residues engaged in metal coordination are conserved in all TIM proteins except in mTIM-2 (highlighted in red in Figure 2C), which had distinct CC' and

FG loops and therefore lacked the pocket where the tartrate penetrates in the mTIM-4 IgV domain (Santiago et al., 2007). The high conservation of the residues involved in metal ion coordination as well as the conserved conformation of the CC' loop suggested that this metal-ion-dependent ligand binding site (MILIBS) will be conserved in the TIM family. Coordination of the metal ion and ligand binding to the pocket required an open conformation of the CC'/FG loop epitope, where both loops must be disconnected (Figure 2). No metal ions were identified by the WaSP program in the mTIM-1 and mTIM-3 structures (PDB accession codes 2OR8 and 2OYP, respectively), where the cavity was closed and the Asn residue at the FG loop was in a conformation not suited for coordination of the metal ion (Figure 1B; Cao et al., 2007; Santiago et al., 2007).

Binding of Phosphatidylserine to the MILIBS

TIM-1 and TIM-4 proteins bind to phosphatidylserine (PS) exposed on the surface of apoptotic cells (Kobayashi et al., 2007). We used X-ray crystallography to identify the PS binding site in the IgV domain of murine TIM proteins by cocrystallization of the isolated N-terminal domain of mTIM-4 with a PS compound having a short fatty acid moiety (C6). The structure of the complex was determined at 2.5 Å resolution (X3 in Table 1).

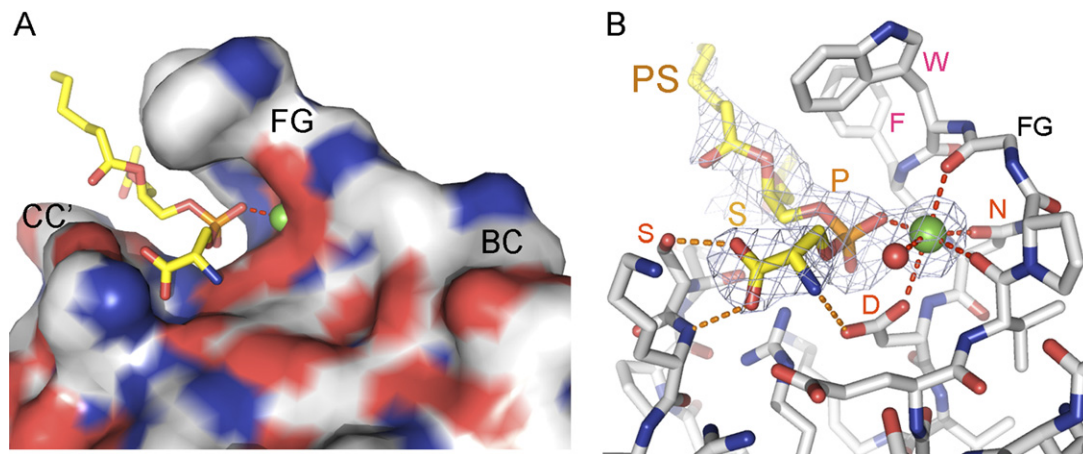


Figure 3. Structure of the mTIM-4 IgV Domain with a Bound Phosphatidylserine Ligand

(A) Surface representation of the top region of the IgV domain structure (X3 in Table 1) with a bound Dicaproyl-PS and the sodium ion to which it coordinates (green sphere). The PS is shown with carbons in yellow, phosphate in orange, oxygens in red, and nitrogens in blue.
(B) Detailed view of the MILIBS and the interactions of the bound PS with the metal ion and with mTIM-4 amino acid residues. Electron $F_o - F_c$ density map shown as a light blue mesh and contoured at 3σ was determined omitting both the PS and the metal ion. Coordinations are shown as dashed red lines, whereas hydrogen bonds are orange. Interacting residues are labeled. The protein atoms are shown as in Figure 2.

The structure revealed that the PS ligand bound to the MILIBS (Figure 3), with its hydrophilic moiety penetrating in the cavity built by the CC' and FG loops. The acidic phosphate group of PS coordinated with the metal ion that was linked to the same mTIM-4 residues and with the same average coordination distance (2.5 Å) seen in the mTIM-4 structure with tartrate (Figure 3B). The bipyramidal metal ion coordination was consistent with the presence of either a sodium or calcium ion according to the WaSP program (Nayal and Cera, 1996), although the temperature B factor was lower for sodium (34) than for calcium (58). A sodium ion was included in the final PDB because of the lower B factor and R_{free} values given by the structure refinement, even though calcium was included in the preparation of the mTIM-4-PS complex at low concentration. The structure of the metal ion coordination site is similar to that seen in a PS annexin-V complex, where the phosphate coordinates with a calcium ion bound mostly to main chain oxygens of a protein loop and the carboxylate of a glutamic acid residue (Swairjo et al., 1995).

The Ser residue of PS fitted between the metal ion and the tip of the CC' loop (Figure 3). Its amine group made specific interactions with the conserved Asp residue involved in metal ion coordination (Figure 3B), whereas the carboxylate of the Ser was hydrogen bonded with a main chain amino and the hydroxyl group of a Ser residue in the CC' loop of the mTIM-4 IgV domain. These interactions were specific for the L stereoisomer of PS used in the crystallization. In the D isomer, the amino and carboxylate groups of the Ser will interchange their positions, so that the carboxylate faces a repulsive electrostatic environment. The size of the phosphate-linked Ser and its interactions with the protein appear to be unique for PS, and they are likely responsible for the restricted phospholipid binding specificity of the TIM proteins (Kobayashi et al., 2007). The fatty acid moiety that

anchors the phospholipid to the lipid bilayer interacts with the hydrophobic side chains of the Trp and Tyr residues in the FG loop (Figure 3), so that they must penetrate into the lipid bilayer upon TIM binding to PS on the surface of apoptotic cells (Kobayashi et al., 2007). Residues on the BC loop such as the Arg found in mTIM-1 and mTIM-4 will be close to the membrane (Figure 3A), and they could interact with the lipid bilayer as well. The BC loop is largely variable among IgV domains of the TIM family (Figure 2C) and bears mTIM-3 polymorphic residues (McIntire et al., 2001). This loop could regulate the PS binding affinity of the TIM proteins. Residue variation in either BC, CC', or FG loops could provide specificity to phospholipid binding by the TIM proteins. Even though TIM-3 conserves the residues involved in metal ion coordination (ND), it does not have any aromatic residue in the FG loop (Figure 2C), which are critical for binding of mTIM-1 and mTIM-4 to PS (see below).

Binding of Murine TIM Proteins to PS and Contribution of the MILIBS

mTIM-1 and mTIM-4 soluble proteins bound to liposomes containing PS, whereas no binding was observed with mTIM-2 (Figure 4A). The TIM proteins did not bind to phosphatidylcholine in liposomes (not shown). mTIM-1 and mTIM-4 shared high sequence similarity in the FG and CC' loops that build the MILIBS and bound similarly to PS, which is indicative of a nearly identical binding mode. Soluble TIM molecules having the isolated IgV domain bound to PS liposomes, whereas no binding was detected with the mucin domain alone (Figure S2; Kobayashi et al., 2007). However, it appears that the mucin domain facilitated binding of the bivalent mTIM soluble molecules to PS liposomes and could be important for presentation of the IgV domain on the cell surface.

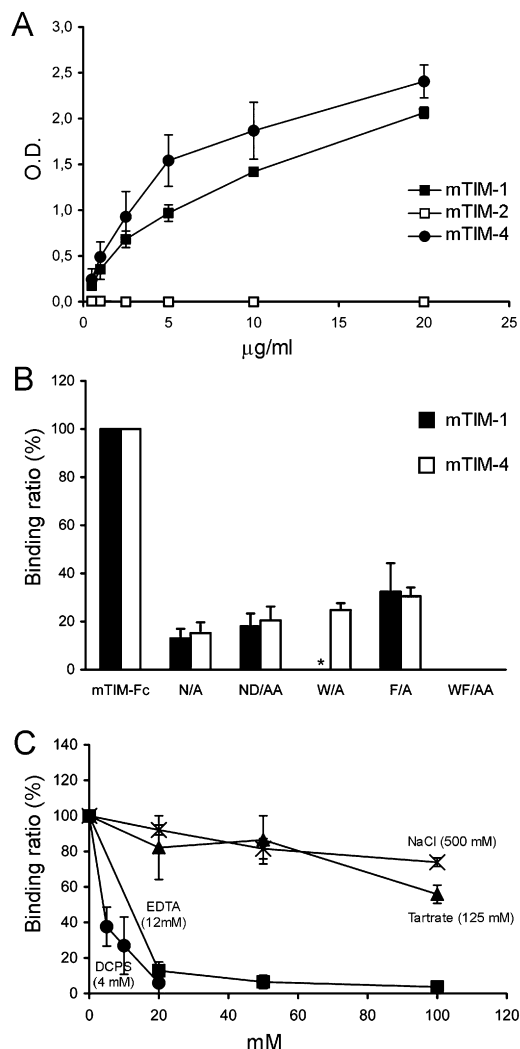


Figure 4. Binding of Murine TIM Proteins to PS in Liposomes and Contribution of the MILIBS

(A) Binding of murine TIM proteins to PS in liposomes. Optical density (O.D.) at 492 nm monitoring binding of soluble Fc fusion proteins with the complete extracellular region to liposomes immobilized on plastic (see Experimental Procedures). Mean \pm SD of three experiments is shown.

(B) Normalized binding of mTIM-1 (dark) and mTIM-4 (white) wild-type and mutant proteins to PS in liposomes. Mutations to Ala included residues involved in metal ion coordination (N/A, ND/AA) or building the MILIBS cavity (W/A, F/A, WF/AA) (Figures 2 and 3). Binding of the mutant Fc fusion proteins were normalized to the wild-type protein binding. Untested mutant is marked with an asterisk. Mean \pm SD of three experiments where the binding ratio was determined with several protein concentrations (20 to 1 μ g/ml) is shown.

(C) Competitors of TIM binding to PS. Binding of mTIM-1 and mTIM-4 Fc fusion proteins at 20 μ g/ml to plastic-bound liposomes was determined in the absence or the presence of the indicated compound as in (A): Dicaproyl-PS (DCPS, circles), EDTA (squares), tartrate (triangles), and NaCl (cross). Binding ratios were determined from the O.D. measured at the indicated inhibitor concentration, and those determined in the absence of inhibitor in three independent experiments for either mTIM-1 or mTIM-4. The concentration of the inhibitory compounds is shown in the x axis. Mean \pm SD of the ratios determined with the mTIM-1 and mTIM-4 proteins are shown. IC₅₀ are in parentheses.

The single (N/A) and double (ND/AA) mutation of the metal ion coordination residues decreased significantly (85%) and similarly binding of mTIM-1 and mTIM-4 proteins to PS in liposomes (Figure 4B), suggesting that both residues shared metal ion coordination required for PS binding (Figure 3B). However, single Ala substitutions of the aromatic residues in the FG loop (W/A or F/A) decreased about 70% binding of the TIM proteins to PS in liposomes, whereas the double mutation had an additive effect and abolished binding (Figure 4B). The dramatic effect of the WF/AA substitution indicated that the FG loop aromatic residues provided most of the binding energy. In good correlation with these results, Ala substitution of MILIBS residues inhibited also TIM-4 binding to PS on apoptotic cells and subsequent cellular phagocytosis of eryptotic red blood cells (Kobayashi et al., 2007).

Binding of the mTIM-1 and mTIM-4 proteins to PS liposomes was inhibited with the dicaproyl PS compound used for crystallization (Figure 4C). The inhibition observed at low concentration of EDTA (Figure 4C) or EGTA (not shown) indicated requirement of divalent calcium ions for high-affinity binding. However, purified mTIM-1-Fc protein bound to PS liposomes without addition of divalent cations (not shown), and the structure of the mTIM-4-PS complex showed that the most likely metal ion coordinated at the MILIBS was sodium (Table 1). Therefore, we can not exclude that the chelating agents blocked binding by penetrating into the binding pocket rather than by chelating divalent ions. The observed inhibitory effect of tartrate was consistent with the binding of this compound to the MILIBS (Figure 2), whereas the moderate inhibitory effect observed at high concentrations of sodium chloride must be electrostatic (Figure 4C). Binding of the TIM proteins to PS was blocked also by TIM antibodies (not shown).

These results proved a highly conserved PS recognition mode in the mTIM-1 and mTIM-4 proteins, consistent with the high similarity of the PS binding pocket revealed by the structure (Figures 2C and 3). Moreover, this binding mode is likely to be shared by human TIM-1 and TIM-4, which have identical PS binding residues at the FG loop compared to the mouse proteins (Figure 2C) and bound to the phospholipid with similar affinities (Kobayashi et al., 2007).

The MILIBS Regulates the Trafficking of mTIM-1 to the Cell Surface

Recently we reported that most of the mTIM-1 protein (C57BL/6J strain variant) expressed in transfected lymphocytes was intracellular and that efficient trafficking of mTIM-1 to the cell surface required stimulation with phorbol esters or ionomycin (Santiago et al., 2007). To determine the role of the MILIBS in the trafficking of mTIM-1 to the cell surface, we analyzed the cellular distribution of fluorescent-tagged mTIM-1 protein mutants by confocal microscopy (Figure 5A). Most of the wild-type protein accumulated in intracellular vesicles, such as reported earlier (Santiago et al., 2007). However, we observed that the mutants lacking either the cation binding (N/A or ND/AA) or the aromatic residues (WF/AA) at the FG loop

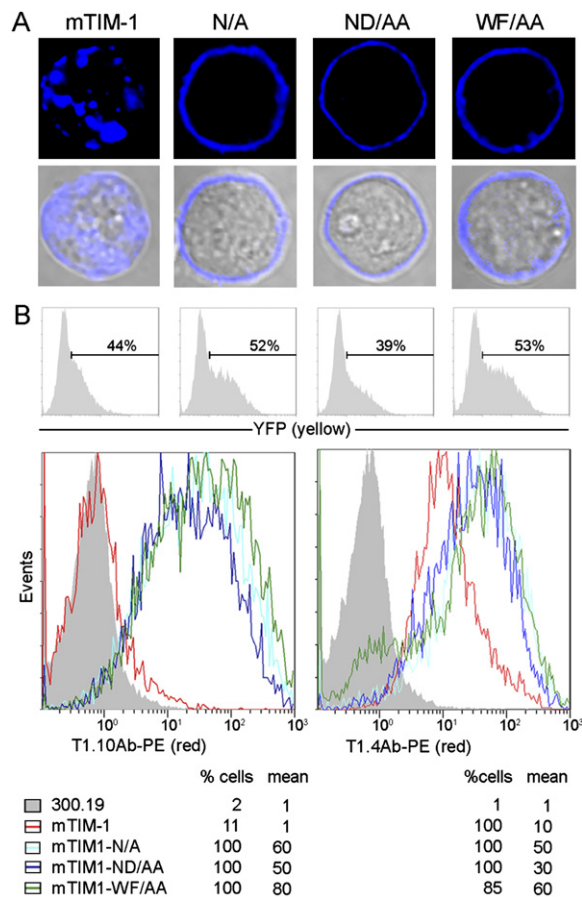


Figure 5. Regulation of mTIM-1 Trafficking to the Cell Surface by the MILIBS

(A) Fluorescence of isolated 300.19 preB cells transfected with wild-type and mutant mTIM-1 proteins tagged with a cyan fluorescent protein (CFP) at their C-terminal ends are shown in the first row. Superimposed fluorescence and DIC confocal images are shown in the second row. The mutant proteins had Ala substitutions in the metal ion coordination residues (N/A and ND/AA) or in the residues on the upper lip (WF/AA) of the MILIBS (Figures 2 and 3). Representative images of three different experiments.

(B) Analysis of cell-surface expression of wild-type and mutant mTIM-1 proteins and presentation of antibody epitopes. Flow cytometry of 300.19 cells transfected with the proteins indicated on the top of the figure tagged with a yellow fluorescent protein (YFP). Confocal images of transfected cells with the YFP-tagged proteins are shown in Figure S3. Histograms on the top show the percentage of transfected cells (yellow), whereas the overlay histograms on the bottom show the detection of the cell-surface-expressed Ab epitopes. Detection was carried out with the T1.4 or T1.10 mTIM-1 Ab and a PE (red)-conjugated secondary antibody. Curves correspond to 300.19 cells untransfected (gray) or transfected with the wild-type (red) or the indicated mutant proteins. The percentage of YFP-positive cells expressing the Ab epitopes on the cell surface (% cell) and the mean fluorescence (mean) are shown below the histograms.

were well expressed on the cell surface, such as we observed with the mTIM-2 protein (Santiago et al., 2007). These results showed that the MILIBS had a marked influence on the cellular distribution of mTIM-1, regulating the trafficking of mTIM-1 to the cell surface.

We analyzed the cell-surface presentation of two distinct IgV domain antibody epitopes (T1.4 and T1.10) mapped onto the IgV domain of wild-type and mutant mTIM-1 soluble proteins (not shown). The antibodies recognized cell-surface-expressed mutant proteins (Figure 5B). However, we observed that the T1.10 epitope in the wild-type protein was greatly diminished with respect to the T1.4 epitope and was detected in just 11% of the transfected 300.19 pre-B cells. In transfected 293T cells, the T1.10 epitope was displayed in about 30% of the cells presenting the T1.4 epitope (not shown). The lower mean fluorescence of the T1.4 antibody on the wild-type compared to the mutant mTIM-1-transfected cells showed lower amount (about 20%) of wild-type mTIM-1 molecules on the cell surface, as also shown by the confocal microscopy (Figure 5A). The differential display of IgV epitopes in the wild-type and the mutant mTIM-1 proteins on the cell surface indicated two distinct conformations for the membrane-bound mTIM-1.

Models for TIM Binding to PS and the Regulation of mTIM-1 Trafficking to the Cell Surface

The structure of the mTIM-4 IgV domain with a bound PS and the functional data on the contribution of MILIBS residues to the interaction led to the proposal of a model for binding of the TIM-1 and TIM-4 IgV domains to membrane-bound PS (Figure 6). The critical contribution of the aromatic residues on the upper lip of the MILIBS to the binding interaction (Figure 4B) and its proximity to the fatty acid moiety of PS (Figure 3) suggested the insertion of the hydrophobic tip of the FG loop into the lipid bilayer upon penetration of the phospholipid hydrophilic head into the binding pocket. The neighboring BC and CC' loops are likely to interact also with the membrane (Figure 6). The interaction of the top region of the IgV domain with the membrane could generate some distortion on the lipid bilayer. This binding model must be shared by the human and mouse TIM-1 and TIM-4 proteins, which bear the same aromatic residues in the tip of the FG loop. Nevertheless, the diversity in the BC and CC' loops among the TIM proteins (Figure 2C) suggests slight differences on their binding interactions with membrane-bound PS.

The increase in the concentration of intracellular calcium related to cell activation induces the appearance of PS on the outer leaflet of the cell membrane (Bratton et al., 1997; Williamson et al., 1992; Zwaal and Schroit, 1997) and mediates the efficient trafficking of mTIM-1 to the cell surface (Santiago et al., 2007). This correlation in the cellular distribution of mTIM-1 and its physiological ligand PS as well as the cell-surface localization of mTIM-1 mutants with a disrupted PS binding suggested that the observed mTIM-1 intracellular accumulation could be dependent on its PS-binding activity. After translocation and folding in the luminal side of the endoplasmic reticulum (ER), type I membrane proteins are linked to the ER membrane by both the N-terminal signal peptide and the transmembrane region. The proximity of the MILIBS to the ER membrane prior to the proteolysis of the signal peptide could allow binding to PS, which would link the

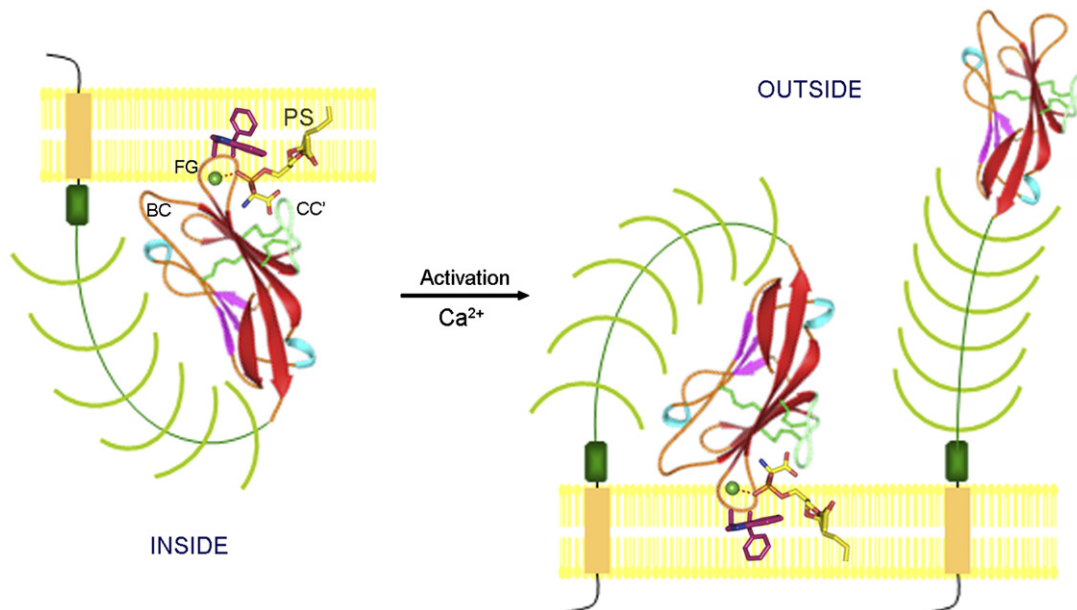


Figure 6. Model for TIM Protein Binding to PS and the Regulation of mTIM-1 Trafficking to the Cell Surface

The picture shows a model for a TIM IgV domain (ribbon representation with β strands in red and pink) interacting with a membrane-bound PS molecule based on the structure presented in Figure 3. The interaction model shows the Trp and Phe residues (magenta) in the tip of the FG loop penetrating into the lipid bilayer (yellow), whereas the phosphate of PS (shown as in Figure 3) coordinates to the metal ion (green sphere) in the binding pocket. The adjacent CC' and BC loops come close to the membrane contributing to the interaction. This binding mode must be representative of the human and mouse TIM-1 and TIM-4 proteins, which bind to PS and bear aromatic residues in the FG loop (Figures 2C and 4; Kobayashi et al., 2007). Inside: Representation of an mTIM-1 protein (mucin domain in green) after folding and cleavage of the signal peptide and with the IgV domain bound to PS and the lipid bilayer through the MILIBS. This conformation represents the intracellular protein seen in resting lymphocytes (mTIM-1 in Figure 5A). Outside: Increasing the intracellular calcium concentration upon cellular activation alters the membrane lipid asymmetry (Zwaal and Schroit, 1997) so that the PS-bound mTIM-1 protein flops toward the outer leaflet of the cell membrane (left), where the IgV domain dissociates from the PS (right). Folded and extended molecules may be present on the cell surface.

tip of the IgV domain to the lipid bilayer (Figure 6). So the N-terminal IgV domain of mTIM-1 could remain bound to the membrane after cleavage of the signal peptide in the ER and the protein would then be sequestered inside the cells. It is known that increasing the intracellular calcium concentration induces transbilayer diffusion of membrane-bound phospholipids (flip-flop) and the exposure of PS on the outer leaflet of the cell surface by the activation of the nonspecific lipid scramblase (Verhoven et al., 1995; Williamson et al., 1992; Zwaal and Schroit, 1997). Therefore, an increase in the intracellular calcium concentration could enhance the exposure of PS-bound TIM proteins to the outer leaflet of the membrane upon cell activation, with subsequent release of the IgV domain from the phospholipid on the cell surface by extracellular factors or by competition with ligands (Figure 6). This model implies the presence of two distinct conformations for the mTIM-1 molecule on the cell surface, supported by the distinct presentation of the T1.10 IgV domain epitope in the wild-type and mutant proteins (Figure 5B).

DISCUSSION

The structures of the mTIM-4 IgV domain identified a metal-ion-dependent ligand binding site (MILIBS) used for binding to phosphatidylserine by the TIM proteins.

The ligand binding specificity is mediated by both the constrained size of the cavity and the requirement for an acidic group in the ligand for coordination with the metal ion. Although the most likely ion seen in the structures is sodium, other cations with similar coordination behavior such as calcium could bind to this site depending on the ligand. The narrow cavity where the PS penetrates is built by two distinctive loops in the IgV domains of TIM proteins, so that the MILIBS is a specific signature of this receptor family. The lack of a ligand binding pocket in mTIM-2 resulting from its distinct CC' loop and the absence of cation coordination residues in its FG loop further prove a divergent ligand recognition mode for this TIM family member (Santiago et al., 2007).

Comparison of the ligand-free mTIM-1 with the mTIM-4 structure in complex with PS showed certain requirements for residue rearrangement on the CC'FG loop epitope for ligand binding. In the open conformation of the MILIBS revealed by the mTIM-4 structure, the hydrophobic Phe and Trp residues on the tip of the loop were primed for penetration into the lipid bilayer upon binding to PS on the cell surface. The hydrophobic tip of the FG loop in TIM-1 and TIM-4 resembles fusion loops described in class II virus membrane proteins (Harrison, 2005), which are known to penetrate into cellular membranes. The interaction of the hydrophobic residues with the cell

membrane would strengthen the monomeric binding of the TIM proteins to PS, whereas the metal ion coordination and the interactions of the Ser residue with the protein must provide the phospholipid binding specificity. Even though the metal ion coordination residues and the conformation of the CC' loop are conserved in all TIM but mTIM-2, there are certain differences in the FG and CC' loops building up the binding pocket. These differences could have a substantial influence on the binding affinity. Additional interaction of the IgV domain with the membrane could be mediated by residues at the tip of the BC loop, such as the Arg residues found in mTIM-1 and mTIM-4 or the residues that defined a polymorphism in the mTIM-3 BC loop (McIntire et al., 2001). The interaction model presented here for TIM binding to PS in cellular membranes is analogous to that proposed for binding of annexin-V and protein kinase C (Swairjo et al., 1995; Verdaguer et al., 1999). In those models, hydrophobic residues near the PS binding site penetrated into the membrane, and residues on neighboring protein loops, such as a Lys in protein kinase C, defined a second interacting site with the bilayer.

Because the expression of TIM-4 is restricted to phagocytic cells, including macrophages and dendritic cells, the binding of PS to TIM-4 suggests that a major function of TIM-4 is the recognition and removal of apoptotic cells by such phagocytic cells (Kobayashi et al., 2007). Indeed, TIM-4-expressing cells rapidly and specifically phagocytized apoptotic cells, and this process was prevented by TIM-4 Ab and mutations in the MILIBS residues. In contrast, because expression of TIM-1 is restricted to T cells and to ischemic kidney cells, the binding of TIM-1 to PS may mediate resolution of ischemic kidney damage by clearance of dying renal tubular epithelial cells and may regulate TIM-1 intracellular trafficking in T cells.

The ability of mTIM-1 to bind phospholipids, its intracellular accumulation, and the absence of the T1.10 antibody epitope in the membrane-bound wild-type protein led us to propose two distinct conformations for the protein on the cell surface that could be shared by TIM proteins binding to PS: one folded molecule with the tip of the IgV domain penetrating into the lipid bilayer and a second extended conformation where the IgV domain would be available for ligand binding on the cell surface. Moreover, TIM binding to PS on its own membrane could sequester the proteins inside of the cell, where PS resides, preventing their exposure on the cell surface for ligand binding and subsequent TIM-mediated intracellular signaling. According to this model, the efficient trafficking of the mTIM-1 protein to the cell surface observed upon cell activation could be related to either its intracellular release from PS or to the flopping of the PS-bound TIM toward the outer leaflet of the cell membrane by changes in the lipid membrane polarity. It is well documented that the increase of the intracellular concentration of calcium during cell activation flops PS out of the cell membrane by the simultaneous activation of the enzyme scramblase and the inhibition of the aminophospholipid-specific translocase (Zwaal and Schroit, 1997). This regulatory mechanism for mTIM-1

trafficking appears to be specific for TIM proteins that bind PS and might differ from other regulatory processes such as that described for CTLA-4 (Linsley et al., 1996).

According to the trafficking regulatory model presented here, the exposure of a functional mTIM-1 and perhaps other TIM proteins for ligand binding would be controlled and restricted to certain cellular conditions. Uncontrolled exposure of TIM molecules on the cell surface could come from changes in the IgV domain affecting its intracellular interaction with PS and the lipid bilayer, such as those seen here with the MILIBS mutants. The length of the variable mucin domain in the TIM proteins could determine also the ability of the IgV domain to bind membrane-bound PS in the ER lumen, so that the trafficking of the proteins to the cell surface could vary among TIM family members. Polymorphisms in mTIM-1 (McIntire et al., 2001), which modify the signal peptide and extend the mucin domain in the BALBc strain variant, could increase the distance between the tip of the IgV domain and the lipid bilayer prior to the cleavage of the signal peptide, preventing binding to PS and facilitating the trafficking of the TIM molecules to the cell surface. This uncontrolled exposure of certain TIM proteins could trigger undesired intracellular signals leading to lymphocyte activation upon binding to exogenous ligands.

We have shown here a unique metal-ion-dependent ligand binding site in the Ig domain of TIM proteins built up by distinctive structural motifs specifically found in the N-terminal domains of this family. We showed that this is a phosphatidylserine binding site and that it could be also involved in recognition of an identified mTIM-3 ligand and HAV, whose binding surface has been mapped on the GFC face of the IgV domain where the MILIBS locates (Cao et al., 2007; Santiago et al., 2007). Preliminary observations indicated the involvement of the MILIBS in TIM-TIM interactions as well. Small molecules containing acidic groups could bind also to the MILIBS, whereas binding to multimeric ligands might crosslink TIM proteins on the cell surface and trigger intracellular signals. The critical contribution of the MILIBS to TIM functions and its concave and well-defined size opens up the rational design of small molecules targeting this site and modulating the functions of the TIM family in the immune system.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Antibodies and cDNAs

mTIM-1 monoclonal antibodies (T1.4 and T1.10) and a mTIM-4 polyclonal antibody used were from eBioscience, Inc. The full-length cDNAs coding for mTIM-1 and mTIM-4 were from the mouse strain C57BL/6J strain and were used as templates for preparation of all the constructs.

Protein Sample Preparation

The mTIM-4 IgV domain was prepared by *in vitro* refolding of inclusion bodies produced in bacteria as described elsewhere (Santiago et al., 2007). The domain had an N-terminal Met residue, residues 43 to 154 of the precursor mTIM-4 protein, a thrombin recognition site, and two epitope tags. The soluble protein eluted from a Superdex-75 column (Amersham Biosciences) with a retention volume around

15–20 kDa. The recombinant proteins were thrombin treated to release C-terminal tags and further purified by ion-exchange chromatography with 25 mM HEPES buffer (pH 7.5).

mTIM-4 Crystallization and Structure Determination

Small crystals of the mTIM-4 domain diffracting at about 3 Å were initially prepared (crystal form X1, Table 1) at a protein concentration of 15 mg/ml and crystallization conditions having 30% PEG-2000 methylether, 5% PEG-400, 0.1 M ammonium sulfate, 0.1 M sodium acetate (pH 5.6), and 100 mM O-(n-Octyl)-phosphorylcholine. The X1 crystals belong to the hexagonal P321 space group, they have one molecule in the asymmetric unit and 55% solvent content. A second crystal form (X2) diffracting at 2.2 Å resolution was prepared with purified protein at 10 mg/ml and 0.8 M potassium sodium tartrate having 0.1 M HEPES (pH 7.5) (Table 1). The crystals have one molecule in the asymmetric unit, 63% of solvent content, and they belong to the hexagonal P6₃22 space group (Table 1). Complexes of the TIM-4 IgV domain and PS were prepared by incubation of the protein (15 mg/ml) with 5 mM 1,2-Dicaproyl-sn-Glycero-3-(Phospho-L-Serine) (Dicaproyl-PS, Avanti) in 25 mM HEPES buffer (pH 7.0) with 5 mM CaCl₂ and 100 mM NaCl. The complex was crystallized at a protein concentration of 15 mg/ml and conditions having 10% Jeffamine, 10 mM FeCl₃, and 0.1 M sodium citrate (pH 5.6). The crystals (form X3) have one molecule in the asymmetric unit, 64% of solvent content, and belong to the hexagonal P6₃22 space group (Table 1). Diffraction data were collected with frozen crystals.

The structures of the mTIM-4 IgV domain were determined by the molecular replacement method with the program Phaser (Read, 2001) and the mTIM-2 structure (2OR7) lacking BC, CC', and FG loops as search model. The X1 crystal form was refined with the program CNS (Brünger et al., 1998), whereas the structure of the X2 and X3 crystal forms were refined with Refmac (CCP4, 1994). Models were adjusted manually during the refinement process. The first two N-terminal and the last four C-terminal residues were poorly defined in the electron density maps. All residues in the structures are in allowed regions of Ramachandran plots. The ribbon representations were prepared with the program ribbons (Carson, 1987), whereas the remaining figures of the structures were done with PYMOL (<http://www.pymol.org>).

Protein Expression in Mammalian Cells

DNAs coding for the indicated fragment of the proteins and having the human IgG1-Fc region (TIM-Fc) at the C terminus were prepared by transient expression in 293T cells, and protein concentration was determined by ELISA (Santiago et al., 2007). Recombinant constructs for expression of isolated mucin domains included the IgK leader sequence from the pDisplay vector (Invitrogen) at their 5' end. Mutagenesis was done by the overlapping PCR technique and confirmed by DNA sequencing. All mutants bound to the specific TIM antibodies as the wild-type soluble proteins in ELISA tests.

Fluorescent-tagged proteins at their cytoplasmic tails were expressed on the surface of 293T or 300.19 pre-B cells by transfection with recombinant TIM cDNAs cloned in-frame with a cyan or yellow fluorescent variant of GFP (CFP or YFP) in the pECFP-N1 or pEYFP-N1 vectors (Clontech), respectively. Expression was analyzed on a D-Eclipse C1 Leika microscope 1 day after transfection with a 435/10 nm and 500/20 nm excitation filter, 455 nm and 515 nm dichroic beam splitter, and a 480/20 nm and 535/30 emission filter, respectively, for CFP and YFP.

Binding of TIM Proteins to Phospholipids in Liposomes

Mixtures of phosphatidylserine:cholesterol (4:1) or phosphatidylcholine:cholesterol (4:1) (Sigma-Aldrich) were resuspended in chloroform:methanol (3:1, v/v). The solvent was removed with a rotary evaporator and finally dried under vacuum. PS and PC liposomes were resuspended in PBS to a final phospholipid concentration of 100 mM and sonicated to clarity. Binding of soluble Fc fusion proteins prepared in mammalian cells to plastic-coated liposomes was carried out in dupli-

cate wells of 96-well plates. Binding of liposomes to the plastic was done by adding 50 µl of the suspension at 0.01 mM to the wells and incubated overnight at 4°C. Cell supernatants containing soluble Fc fusion proteins were diluted with DMEM (Invitrogen) having 5% FCS at the indicated protein concentration, and binding assays were carried out essentially as performed for TIM-TIM protein binding (Santiago et al., 2007). Background binding signal to wells lacking liposomes was subtracted from optical density determined in wells with liposomes.

Supplemental Data

Three figures are available at <http://www.immunity.com/cgi/content/full/27/6/941/DC1/>.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the European Synchrotron Radiation Facility for provision of synchrotron radiation facilities through the MX-490 and MX-601 BAG projects. We are grateful to D.T. Umetsu and R. DeKruyff for helpful discussions. This work was supported by grants from the Ministerio de Educacion y Ciencia of Spain (BFU2005-05972) and CAM-CSIC (200520M028) to J.M.C. and from NIH AI054456 to G.J.F. and G.G.K.

Received: July 27, 2007

Revised: October 31, 2007

Accepted: November 19, 2007

Published online: December 13, 2007

REFERENCES

- Bratton, D.L., Fadok, V.A., Richter, D.A., Kailey, J.M., Guthrie, L.A., and Henson, P.M. (1997). Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J. Biol. Chem.* 272, 26159–26165.
- Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N.S., et al. (1998). Crystallography and NMR system (CNS): a new software system for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 54, 905–921.
- Cao, E., Zang, X., Ramagopal, U.A., Mukhopadhyaya, A., Fedorov, A., Fedorov, E., Zencheck, W.D., Lary, J.W., Cole, J.L., Deng, H., et al. (2007). T cell immunoglobulin mucin-3 crystal structure reveals a galectin-9-independent ligand-binding surface. *Immunity* 26, 311–321.
- Carson, M. (1987). Ribbon models of macromolecules. *J. Mol. Graph.* 5, 103–106.
- Chakravarti, S., Sabatos, C.A., Xiao, S., Illes, Z., Cha, E.K., Sobel, R.A., Zheng, X.X., Strom, T.B., and Kuchroo, V.K. (2005). Tim-2 regulates T helper type 2 responses and autoimmunity. *J. Exp. Med.* 202, 437–444.
- Chen, T.T., Li, L., Chung, D.H., Allen, C.D., Torti, S.V., Torti, F.M., Cyster, J.G., Chen, C.Y., Brodsky, F.M., Niemi, E.C., et al. (2005). TIM-2 is expressed on B cells and in liver and kidney and is a receptor for H-ferritin endocytosis. *J. Exp. Med.* 202, 955–965.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 50, 760–763.
- Feigelsstock, D., Thompson, P., Mattoo, P., Zhang, Y., and Kaplan, G.G. (1998). The human homolog of *HAVcr-1* codes for a hepatitis A virus cellular receptor. *J. Virol.* 72, 6621–6628.
- Han, W.K., and Bonventre, J.V. (2004). Biologic markers for the early detection of acute kidney injury. *Curr. Opin. Crit. Care* 10, 476–482.
- Harding, M. (2002). Metal-ligand geometry relevant to proteins and in proteins: sodium and potassium. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58, 872–874.

- Harrison, S.C. (2005). Mechanism of membrane fusion by viral envelope proteins. *Adv. Virus Res.* 64, 231–261.
- Kaplan, G., Totsuka, A., Thompson, P., Akatsuka, T., Moritsugu, Y., and Feinstone, S.M. (1996). Identification of a surface glycoprotein on african green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *EMBO J.* 15, 4282–4296.
- Kobayashi, N., Karisola, P., Peña-Cruz, V., Dorfman, D.M., Jinushi, M., Umetsu, S.E., Butte, M.J., Nagumo, H., Chernova, I., Zhu, B., et al. (2007). TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. *Immunity* 27, this issue, 927–940.
- Kuchroo, V.K., Umetsu, D.T., DeKruyff, R.H., and Freeman, G.J. (2003). The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 454–462.
- Kuchroo, V.K., Meyers, J.H., Umetsu, D.T., and DeKruyff, R.H. (2006). TIM family of genes in immunity and tolerance. *Adv. Immunol.* 91, 227–249.
- Kumanogoh, A., Marukawa, S., Suzuki, K., Takegahara, N., Watanabe, C., Ch'ng, E., Ishida, I., Fujimura, H., Sakoda, S., Yoshida, K., and Kikutani, H. (2002). Class IV semaphorin Sema4A enhances T-cell activation and interacts with Tim-2. *Nature* 419, 629–633.
- Linsley, P.S., Bradshaw, J., Greene, J., Peach, R., Bennett, K., and Mittler, R.S. (1996). Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity* 4, 535–543.
- McIntire, J.J., Umetsu, S.E., Akbari, O., Potter, M., Kuchroo, V.K., Barsh, G.S., Freeman, G.J., Umetsu, D.T., and DeKruyff, R.H. (2001). Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nat. Immunol.* 2, 1109–1116.
- McIntire, J.J., Umetsu, S.E., Macaubas, C., Hoyte, E.G., Cinnioğlu, C., Cavalli-Sforza, L.L., Barsh, G.S., Hallmayer, J.F., Underhill, P.A., Risch, N.J., et al. (2003). Hepatitis A virus link to atopic disease. *Nature* 425, 576.
- Meyers, J.H., Chakravarti, S., Schlesinger, D., Illes, Z., Waldner, H., Umetsu, S.E., Kenny, J., Zheng, X.X., Umetsu, D.T., DeKruyff, R.H., et al. (2005). TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1-TIM-4 interaction regulates T cell proliferation. *Nat. Immunol.* 6, 455–464.
- Nayal, M., and Cera, E.D. (1996). Valence screening of water in protein crystals reveals potential Na⁺ binding sites. *J. Mol. Biol.* 256, 228–234.
- Read, R.J. (2001). Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 57, 1373–1382.
- Rennett, P.D., Ichimura, T., Sizing, I.D., Bailly, V., Li, Z., Rennard, R., McCoon, P., Pablo, L., Miklasz, S., Tarilonte, L., and Bonventre, J.V. (2006). T cell, Ig domain, mucin domain-2 gene-deficient mice reveal a novel mechanism for the regulation of Th2 immune responses and airway inflammation. *J. Immunol.* 177, 4311–4321.
- Sabatos, C.A., Chakravarti, S., Cha, E., Schubart, A., Sanchez-Fueyo, A., Zheng, X.X., Coyle, A.J., Strom, T.B., Freeman, G.J., and Kuchroo, V.K. (2003). Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nat. Immunol.* 4, 1102–1110.
- Sanchez-Fueyo, A., Tian, J., Picarella, D., Domenig, C., Zheng, X.X., Sabatos, C.A., Manlongat, N., Bender, O., Kamradt, T., Kuchroo, V.K., et al. (2003). Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nat. Immunol.* 4, 1093–1101.
- Santiago, C., Ballesteros, A., Tami, C., Martinez-Munoz, L., Kaplan, G.G., and Casasnovas, J.M. (2007). Structures of T cell immunoglobulin mucin receptors 1 and 2 reveal mechanisms for regulation of immune responses by the TIM receptor family. *Immunity* 26, 299–310.
- Silberstein, E., Xing, L., van de Beek, W., Lu, J., Cheng, H., and Kaplan, G.G. (2003). Alteration of hepatitis A virus (HAV) particles by a soluble form of HAV cellular receptor 1 containing the immunoglobulin- and mucin-like regions. *J. Virol.* 77, 8765–8774.
- Swairjo, M.A., Concha, N.O., Kaetzel, M.A., Dedman, J.R., and Seaton, B.A. (1995). Ca²⁺-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2, 968–974.
- Umetsu, S.E., Lee, W.L., McIntire, J.J., Downey, L., Sanjanwala, B., Akbari, O., Berry, G.J., Nagumo, H., Freeman, G.J., Umetsu, D.T., and DeKruyff, R.H. (2005). TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. *Nat. Immunol.* 6, 447–454.
- Verdaguer, N., Corbalan-Garcia, S., Ochoa, W.F., Fita, I., and Gómez-Fernández, J.C. (1999). Ca²⁺ bridges the C2 membrane-binding domain of protein kinase C directly to phosphatidylserine. *EMBO J.* 18, 6329–6338.
- Verhoven, B., Schlegel, R.A., and Williamson, P. (1995). Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 182, 1597–1601.
- Vila, M.R., Kaplan, G.G., Feigelshtock, D., Nadal, M., Morote, J., Porta, R., Bellmunt, J., and Meseguer, A. (2004). Hepatitis A virus receptor blocks cell differentiation and is overexpressed in clear cell renal cell carcinoma. *Kidney Int.* 65, 1761–1773.
- Wilker, P.R., Sedy, J.R., Grigura, V., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2007). Evidence for carbohydrate recognition and homotypic and heterotypic binding by the TIM family. *Int. Immunol.* 19, 763–773.
- Williamson, P., Kulick, A., Zachowski, A., Schlegel, R.A., and Devaux, P.F. (1992). Ca²⁺ induces transbilayer redistribution of all major phospholipids in human erythrocytes. *Biochemistry* 31, 6355–6360.
- Zhu, C., Anderson, A.C., Schubart, A., Xiong, H., Imitola, J., Khoury, S.J., Zheng, X.X., Strom, T.B., and Kuchroo, V.K. (2005). The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat. Immunol.* 6, 1245–1252.
- Zwaal, R.F.A., and Schroit, A.J. (1997). Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 89, 1121–1132.

Accession Numbers

The atomic coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank with the accession numbers 3BI9 (X1), 3BIA (X2), and 3BIB (X3).



Available Now R&D Systems 2010 Catalog
Offering more than 15,000 Quality Products
Click here to request your copy today

R&D
SYSTEMS®

The Journal of Immunology

This information is current as
of January 18, 2010

T Cell/Transmembrane, Ig, and Mucin-3 Allelic Variants Differentially Recognize Phosphatidylserine and Mediate Phagocytosis of Apoptotic Cells

Rosemarie H. DeKruyff, Xia Bu, Angela Ballesteros,
César Santiago, Yee-Ling E. Chim, Hyun-Hee Lee, Piia
Karisola, Muriel Pichavant, Gerardo G. Kaplan, Dale T.
Umetsu, Gordon J. Freeman and José M. Casasnovas

J. Immunol. published online Jan 18, 2010;
doi:10.4049/jimmunol.0903059

Supplementary Data

<http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/jimmunol.0903059/D>
C1

Subscriptions

Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is
online at <http://www.jimmunol.org/subscriptions/>

Permissions

Submit copyright permission requests at
<http://www.aai.org/ji/copyright.html>

Email Alerts

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign
up at <http://www.jimmunol.org/subscriptions/etoc.shtml>



T Cell/Transmembrane, Ig, and Mucin-3 Allelic Variants Differentially Recognize Phosphatidylserine and Mediate Phagocytosis of Apoptotic Cells

Rosemarie H. DeKruyff,^{*,†,1} Xia Bu,^{‡,§,1} Angela Ballesteros,^{¶,1} César Santiago,[¶] Yee-Ling E. Chim,^{*,†} Hyun-Hee Lee,^{*,†} Piia Karisola,^{*,†} Muriel Pichavant,^{*,†} Gerardo G. Kaplan,^{||} Dale T. Umetsu,^{*,†} Gordon J. Freeman,^{‡,§,2} and José M. Casasnovas^{¶,2}

T cell/transmembrane, Ig, and mucin (TIM) proteins, identified using a congenic mouse model of asthma, critically regulate innate and adaptive immunity. TIM-1 and TIM-4 are receptors for phosphatidylserine (PtdSer), exposed on the surfaces of apoptotic cells. Herein, we show with structural and biological studies that TIM-3 is also a receptor for PtdSer that binds in a pocket on the N-terminal IgV domain in coordination with a calcium ion. The TIM-3/PtdSer structure is similar to that of TIM-4/PtdSer, reflecting a conserved PtdSer binding mode by TIM family members. Fibroblastic cells expressing mouse or human TIM-3 bound and phagocytosed apoptotic cells, with the BALB/c allelic variant of mouse TIM-3 showing a higher capacity than the congenic C.D2 Es-Hba-allelic variant. These functional differences were due to structural differences in the BC loop of the IgV domain of the TIM-3 polymorphic variants. In contrast to fibroblastic cells, T or B cells expressing TIM-3 formed conjugates with but failed to engulf apoptotic cells. Together these findings indicate that TIM-3-expressing cells can respond to apoptotic cells, but the consequence of TIM-3 engagement of PtdSer depends on the polymorphic variants of and type of cell expressing TIM-3. These findings establish a new paradigm for TIM proteins as PtdSer receptors and unify the function of the TIM gene family, which has been associated with asthma and autoimmunity and shown to modulate peripheral tolerance. *The Journal of Immunology*, 2010, 184: 000–000.

The T cell/transmembrane, Ig, and mucin (TIM) genes comprise a family with diverse functions in regulating immunity in both mice and humans (1, 2). Using a congenic mouse model of allergen-induced airway hyperreactivity (AHR), the eight murine TIM family members were identified by positional cloning in the T cell airway phenotype regulatory (*Tapr*) locus (3). The human TIM (hTIM) gene family orthologues include TIM-1, TIM-3, and TIM-4 (3, 4). TIM-1, an important susceptibility gene for asthma and allergy (5), is preferentially expressed on Th2 cells and functions as a potent costimulatory molecule for T cell activa-

tion (6). TIM-3 is preferentially expressed on Th1 cells but is also expressed on dendritic cells (DCs) (1) and generates an inhibitory signal resulting in the apoptosis of Th1 cells (7). TIM-4 is exclusively expressed on APCs and may play an important role in mediating tolerance (8, 9).

TIM proteins are type I cell surface glycoproteins with common structural features including Ig-like, mucin, transmembrane, and cytoplasmic domains. The crystal structures of murine TIM-1, TIM-2, TIM-3, and TIM-4 Ig-like domains have been determined (10–12). All are IgV domains with a long CC' loop folded back onto the GFC β -sheet, which is held in place by two disulfide bonds formed by the four noncanonical cysteine residues found in all of the TIM proteins. Structures of the mouse TIM-4 (mTIM-4) protein showed that the CC' and FG loops form a narrow cavity or pocket in which phosphatidylserine (PtdSer) binds (11). The phosphate of PtdSer coordinates at the base of the cavity with a metal ion that is also bound to conserved residues in the FG loop in all of the TIM proteins except mTIM-2, which does not bind PtdSer (11). This conserved binding pocket has been termed the metal ion-dependent ligand binding site (MILIBS).

The function of TIM-1 and TIM-4 as receptors for PtdSer confers important properties to cells expressing these molecules. PtdSer is normally localized to the inner leaflet of the plasma membrane, but it is redistributed and exposed on the outer membrane when the cell is activated or undergoes apoptosis. PtdSer on apoptotic cells provides a key signal that triggers cell engulfment (13, 14). The TIM gene family plays a critical role in regulating tolerance and immune responses (6, 15–19). Because rapid removal of apoptotic cells by phagocytes is critical for the maintenance of tolerance and prevention of autoimmunity (20, 21), TIM proteins may play critical roles in regulating tolerance by mediating the clearance of apoptotic cells. Indeed, we and others showed that TIM-1 and TIM-4 bind PtdSer exposed on apoptotic cells, and when expressed on certain

^{*}Division of Immunology, Children's Hospital Boston, [†]Department of Pediatrics, and [‡]Department of Medicine, Harvard Medical School; and [§]Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA 02115; [¶]Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Campus Universidad Autónoma, Madrid, Spain; and ^{||}Center for Biologics Evaluation and Research, Food and Drug Administration, Bethesda, MD 20892

¹R.H.D., X.B., and A.B. contributed equally to this work.

²G.J.F. and J.M.C. contributed equally to this work.

Received for publication September 16, 2009. Accepted for publication December 1, 2009.

This work was supported by National Institutes of Health Grants P01 AI054456 (to D.T.U., G.J.F., R.H.D., and G.G.K.) and HL069507 (to R.H.D.) and Ministerio de Ciencia e Innovación Grants BFU2005-05972 and BFU2008-00971 (to J.M.C.).

The structure presented in this article has been submitted to the Protein Data Bank under accession number 3KAA.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Gordon J. Freeman, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, 44 Binney Street, Boston, MA 02115. E-mail address: gordon_freeman@dfci.harvard.edu

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this paper: AHR, airway hyperreactivity; BMDC, bone marrow-derived dendritic cell; CMFDA, CellTracker Green; CMTMR, CellTracker Orange; DC, dendritic cell; DCPtdSer, 1,2-dicaproyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine; HBA, C.D2 Es-Hba; hTIM, human TIM; mTIM, mouse TIM; MILIBS, metal ion-dependent ligand binding site; PC, phosphatidylcholine; PDB, Protein Data Bank; PtdSer, phosphatidylserine; TIM, T cell/transmembrane, Ig, and mucin.

cell types such as a peritoneal macrophage or 3T3 cells, both TIM-1 and TIM-4 facilitate engulfment of apoptotic cells (8, 9, 22).

The purpose of the current study was to examine the detailed interaction of TIM-3 with PtdSer and determine whether TIM-3 polymorphic variants differed in recognition of apoptotic cells. mTIM-3 was initially reported not to bind PtdSer (9), but a recent study found that TIM-3 binds PtdSer and that CD8⁺ DCs expressing TIM-3 phagocytose apoptotic cells (23). We found that both hTIM-3 and mTIM-3 are receptors for PtdSer, based on binding studies and a crystal structure, and that TIM-3-expressing cells bound or engulfed apoptotic cells expressing PtdSer, or both. Furthermore, allelic variants of TIM-3 had distinct binding and phagocytic properties, with the BALB/c allele demonstrating stronger binding and phagocytosis of apoptotic cells compared with the C.D2 Es-Hba (HBA) allele. Moreover, although fibroblasts or APCs expressing TIM-3 phagocytosed apoptotic cells, T cells expressing TIM-3 bound but did not engulf apoptotic cells. Together these findings suggest that TIM-3-expressing DCs, macrophages, and T cells can sense the presence of apoptotic cells but that the consequence of TIM-3 engagement of PtdSer depends on the specific polymorphic variants of and the type of cell expressing TIM-3.

Materials and Methods

Mice

All of the mouse experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of the Dana-Farber Cancer Institute or Children's Hospital (Boston, MA). BALB/cByJ mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME).

Preparation of peritoneal macrophages

To collect resident peritoneal cells, mice were sacrificed and the peritoneal cavities were infused with 3 ml ice-cold PBS with 0.3% BSA and 0.1 mM EDTA and washed in PBS containing 2% FBS. Cells were enriched for adherent cells by incubation in tissue culture dishes for 2 h and rinsed to remove nonadherent cells. Cells were detached using 0.5 mM EDTA in PBS.

Bone marrow-derived DCs

Bone marrow-derived DCs (BMDCs) were generated from wild-type mice using GM-CSF as previously described with some modifications (24, 25). On day 7, some DCs were treated at 1.0×10^6 DCs/ml with cholera toxin (5 µg/ml). DCs were collected after 24 h and analyzed by flow cytometry.

Preparation of bronchial epithelial cells

Mouse primary airway epithelial cells were prepared as follows. Briefly, lungs were digested for 25 min in dissociation buffer containing pronase (1 mg/ml; *Streptomyces griseus* protease; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Cells were filtered to remove debris, and macrophages were depleted by adherence to tissue culture dishes for 1 h at 37°C. Nonadherent cells were plated on plates precoated with BD Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA) in Airway Epithelial Cell Growth Medium (Promo Cell, Heidelberg, Germany). After 2 wk, >95% of the cells were cytokeratin-positive when stained with Cyto-keratin 5 + 8 Ab RCK102 (Abcam, Cambridge, MA) (data not shown).

Generation of mAbs

TIM-3 mAbs 7D11, 10G12, and 11G8 (all mouse IgG1) for hTIM-3 were made as described elsewhere (M. Pichavant, A.P.G. Silva, H.Y. Kim, H.-H. Lee, R.E. Sells, H. Nagumo, N. Kobayashi, S.E. Umetsu, Y.-L.E. Chim, V. Shaw, D.M. Dorfman, G.J. Freeman, D.T. Umetsu, and R.H. DeKruyff, submitted for publication) and recognized hTIM-3 but not hTIM-1 or hTIM-4 on transfected 300.19 cells and did not react with untransfected cells (Supplemental Fig. 1).

Cell lines

The human macrophage cell lines THP-1, MD, and KMA and the mouse macrophage cell lines RAW264.7, PMJ2R, and MH-S were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA) and maintained in media recommended by American Type Culture Collection.

Transfected cell lines

NIH 3T3, 300.19, or DO11.10 hybridoma cells were stably transfected by electroporation with a pEF6 plasmid containing mTIM-3 (HBA allele), mTIM-3 (BALB/c allele), mTIM-1 (BALB/c allele), or hTIM-3 or with

pEF6 vector only. Cells were selected with blasticidin or puromycin and sorted twice by flow cytometry with specific Abs for mTIM-3 (RMT3-23-PE), hTIM-3 (11G8), or mTIM-1 (3B3).

Preparation of apoptotic cells and eryptotic RBCs

Thymocytes isolated from 4- to 6-wk-old wild-type BALB/c mice were incubated with 10 µM dexamethasone (Sigma-Aldrich) in RPMI 1640 without FCS for 3 h. Cells were washed, and apoptosis was confirmed by annexin V-FITC and propidium iodide staining (BD Pharmingen, San Diego, CA). Eryptotic mouse RBCs were prepared as described (8).

Assay for binding of apoptotic cells

Apoptotic thymocytes or transfected 300.19 cells were labeled with 4 µM PKH67 (Sigma-Aldrich; FL1 channel) or PKH26 (Sigma-Aldrich; FL2 channel) according to the manufacturer's instructions. TIM-transfected 300.19 cells (10×10^4) or control human PD-L1-transfected 300.19 cells were incubated with apoptotic thymocytes (30×10^4) in RPMI 1640 containing 10% FBS at 37°C for 30–120 min, gently resuspended and analyzed by flow cytometry gating on the transfected cell population. For blocking experiments, transfected cells were preincubated with TIM mAb or isotype control mAb for 15 min at room temperature. Apoptotic thymocytes were added, and incubation was continued at 37°C for the indicated time. In some experiments, coincubation was performed in media containing EGTA (0.5–5 mM).

Assay for engulfment of apoptotic cells by flow cytometry

For measurement of phagocytosis by TIM-transfected 3T3 cells, 1.0×10^5 3T3 cells were seeded in six-well plates and cultured overnight. Apoptotic thymocytes were labeled with pHrodo (1.5 µM; Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions and added to the 3T3 cells in the ratio of 20:1. After 2–3 h of incubation at 37°C, wells were quickly washed three times with PBS containing 2% FBS and 0.1 mM EDTA to remove nonadherent apoptotic cells. 3T3 cells were detached with PBS containing 0.5 mM EDTA, resuspended in PBS containing 2% FBS and 0.1 mM EDTA, and analyzed by flow cytometry, gating on 3T3 cells by forward and side scatter. To evaluate phagocytosis by 300.19 or DO11.10 hybridoma cells, cells were cocultured with pHrodo-labeled apoptotic thymocytes for 2 h at 37°C, washed, and analyzed by flow cytometry.

Confocal microscopy

For confocal microscopy, 3T3 cells were labeled with CellTracker Green (CMFDA) (2–4 µM) (Invitrogen), incubated with pHrodo-labeled apoptotic thymocytes, and washed as described above. Cells were fixed with 3.7% formaldehyde in PBS for 10 min at room temperature, washed once with PBS, and analyzed by confocal microscopy. DO11.10 hybridoma or 300.19 cells were labeled with CMFDA or CellTracker Orange (CMTMR) (Invitrogen), cocultured with apoptotic thymocytes or eryptotic RBCs labeled with CMTMR or PKH26 for 60 min at 37°C as indicated in the figure legend, and analyzed by confocal microscopy. Confocal micrographs in Figs. 6 and 7 were acquired by a C1 Plus-equipped TE2000-U microscope (Nikon, Melville, NY) using 488- and 543-nm lasers with 525/550- and 590/550-nm filter sets. Z-stack images were taken using a 60× plan apochromatic objective. Plane- and volume-rendered images were processed with Adobe Photoshop (version 11; Adobe, San Jose, CA) and EZ-C1 (version 3.8; Nikon Instruments, Melville, NY) software. Confocal images in Fig. 8 were acquired using a TE-2000 inverted microscope (Nikon) with attached Orca AG camera (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan) at ×100 magnification and 37°C in DMEM. Slidebook software (Intelligent Imaging Innovations, Philadelphia, PA) was used to create XZ and XY views from the confocal image stacks and to adjust the brightness and contrast for display.

Flow cytometry

Analytical flow cytometry was carried out using a FACSCanto (BD Biosciences), and the data were processed using the FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR). For characterization of mAbs, untransfected or TIM-1-, TIM-3-, or TIM-4-transfected 300.19 cells were incubated with mAbs and stained with PE-conjugated goat anti-mouse or anti-rat Ig (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL). For detection of TIM-3 expression on freshly isolated cells, cells were isolated and Fc receptors were blocked with excess anti-Fc receptor (mAb 2.4G2, purified from hybridoma HB197; American Type Culture Collection) for 20 min at 4°C prior to staining. Peritoneal cells were stained with Alexa Fluor 700-conjugated CD11b Ab (eBioscience, San Diego, CA) and costained with PE-conjugated TIM-3 mAb RMT3-23 (eBioscience), TIM-1 mAb 3B3 (6), TIM-4 mAb 21H12 (8), or isotype control (eBioscience).

Crystallization of the DCPtdSer/mTIM-3 complex and structure determination

The isolated mTIM-3 IgV domain was prepared by *in vitro* refolding of inclusion bodies produced in bacteria as described for other mTIMs (11, 12). The refolded protein has an N-terminal Met residue, residues 21–133 of the precursor protein (3), a thrombin recognition site, and two epitope tags at the C-terminal end. For crystallization, the recombinant mTIM-3 protein was thrombin-treated to release C-terminal tags and further purified by ion-exchange chromatography using 25 mM sodium acetate buffer pH 5.6. Complexes of the mTIM-3 IgV domain and the phospholipid were prepared by incubation of the protein (15 mg/ml) with 5 mM 1,2-dicaproyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (DCPtdSer) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) in 25 mM HEPES buffer (pH 7.0) with 5 mM CaCl₂ and 100 mM NaCl. The complex was crystallized using sitting drops under paraffin oil at a protein concentration of 15 mg/ml and 22% polyethylene glycol 4000, 50 mM NaF, 5 mM CaCl₂, and 0.1 M sodium citrate (pH 5.6). The crystals have two molecules in the asymmetric unit and 50% solvent content and belong to the R32 space group (Table I).

The crystal structure was determined by the molecular replacement method using the program Phaser (26) and the mTIM-3 structure without ligand as search model (Protein Data Bank [PDB] ID: 2OYP) (10). The structure was refined using the program PHENIX 1.4 (www.phenix-online.org). Models were adjusted manually during the refinement process. The N- and C-terminal five residues of the mTIM-3 protein were poorly defined and are missing in the final structure. All of the residues in the structure are in allowed regions of the Ramachandran plot. Fig. 2A was prepared with RIBBONS (www.cbse.uab.edu/ribbons), and the remaining figures of the structure were prepared with PYMOL (www.pymol.org).

Binding of TIM proteins to phospholipids in liposomes

Liposomes containing PtdSer and phosphatidylcholine (PC) were prepared as described elsewhere (11). They were diluted in PBS to a final phospholipid concentration of 10 mM and added (50 μ l) to wells of 96-well plates for binding to plastic. Preparation of TIM-Fc fusion proteins and analysis of protein binding to plastic-bound PtdSer and PC liposomes were carried out for 1 h at 37°C as previously described (11). Background binding signal to wells lacking liposomes was subtracted from the OD determined in wells with liposomes. Specific binding of the proteins to wells coated with PtdSer was determined by subtracting the OD obtained in wells coated with PC. A range of protein concentrations as shown in Fig. 1B (0.5–20 μ g/ml) was used for the analysis of PtdSer binding by mutant TIM-Fc proteins. Relative

binding (mutant versus wild type) was determined from those protein concentrations giving a significant binding (OD > 0.1) and the average binding for all of those concentrations calculated in each experiment.

Results

TIM-3 is a PtdSer receptor with a binding pocket in its IgV domain

Structural and biochemical studies have shown that TIM-1 and TIM-4 bind to PtdSer (8, 11). Both TIM-1 and TIM-4 have MILIBS motifs with the amino acids Asn and Asp coordinating a metal ion, which in turn coordinates with the charged head of PtdSer (Fig. 1A, red) (11). Because these amino acids are conserved in TIM-3, as are the adjacent hydrophobic amino acids in the FG loop (WF in TIM-1 and TIM-4 and LM in TIM-3) (Fig. 1A, magenta), we asked whether the MILIBS in TIM-3 might also bind PtdSer.

We prepared mTIM-1-Fc, mTIM-2-Fc, mTIM-3-Fc, and mTIM-4-Fc fusion proteins and compared their binding to PtdSer in liposomes immobilized on plastic. As previously reported, TIM-2 does not bind PtdSer and served as a negative control (8, 9, 11). The mTIM-3 (BALB/c) protein bound to PtdSer but with a lower affinity than either mTIM-1 or mTIM-4 (Fig. 1B). Compared with TIM-1 or TIM-4, mTIM-3 had ~50% PtdSer binding affinity at longer incubation times and equilibrium conditions (Fig. 1C). All three mTIM proteins showed rapid kinetics in binding to PtdSer.

To gain further insight into the PtdSer binding site, we crystallized the isolated N-terminal IgV domain of BALB/c mTIM-3 in complex with a PtdSer compound having a short fatty acid moiety (DCPtdSer). Diffraction data extending to 3.0 Å resolution were used for structure determination (Table I and *Materials and Methods*; PDB ID: 3KAA, www.rcsb.org/pdb/home/home.do). As described for the other TIM protein structures (10–12), the IgV domain has longer β -strands in the GFC β -sheet than in the BED β -sheet, (Fig. 2A) and the folded conformation of the CC' loop

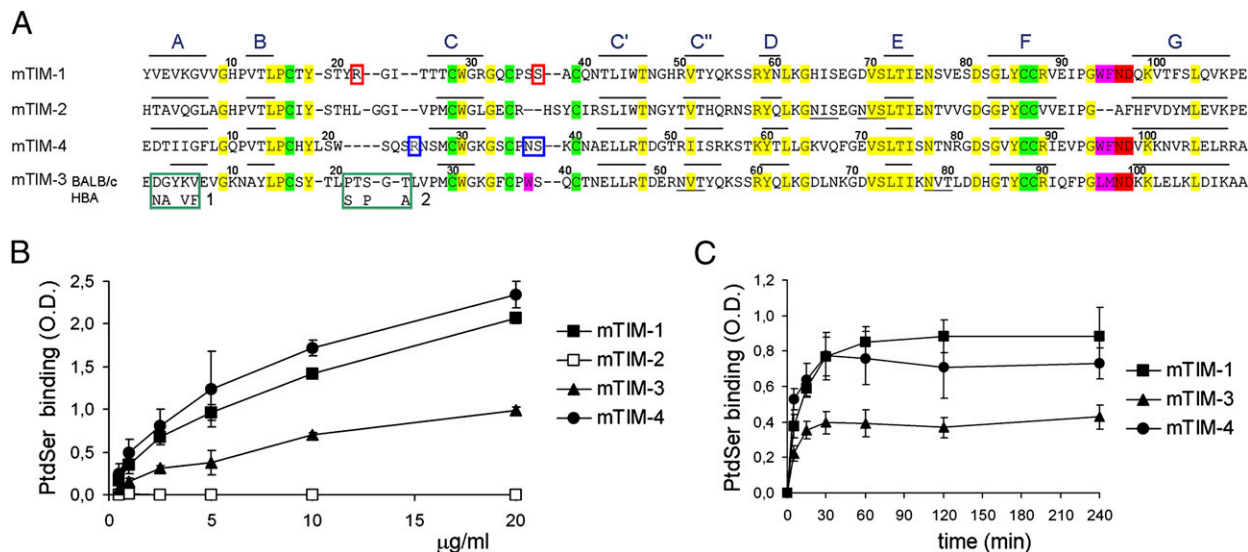


FIGURE 1. TIM-3 has a MILIBS motif and binds to PtdSer. *A*, Structural alignment of mTIM IgV domain structures. The reported structures of mTIM-1 (PDB ID: 2OR8), mTIM-2 (PDB ID: 2OR7), and mTIM-4 (PDB ID: 3BIB) and the mTIM-3 structure presented in Fig. 2 (PDB ID: 3KAA) were aligned using the program malig3d (<http://salilab.org/modeller/modeller.html>) with a gap penalty of 3. β -Strands are shown with lines over the corresponding sequence and their names on top. N-linked glycosylation sites are underlined. Cysteines conserved in all of the TIMs and amino acids conserved in most TIMs are highlighted in green and yellow, respectively. The MILIBS residues engaged in metal ion coordination (ND) and the hydrophobic residues in the FG loop are highlighted in red and magenta, respectively. The Trp residue in the tip of the mTIM-3 CC' loop is also shown in magenta. The two polymorphic regions (1 and 2) in BALB/c and HBA TIM-3 are indicated by green boxes. Residues mutated in mTIM-1 and mTIM-4 proteins for the PtdSer binding analysis shown in Fig. 4 are marked with red and blue boxes, respectively. *B*, Binding of mTIM-Fc proteins to PtdSer in liposomes. Binding of soluble Fc fusion proteins with the complete extracellular region to liposomes immobilized on plastic at 37°C was monitored by OD at 492 nm (see *Materials and Methods*). *C*, Binding of mTIM-Fc (5 μ g/ml) proteins to PtdSer over time. Binding was monitored as in *B* at the indicated times at room temperature. Mean \pm SD of three experiments is shown in *B* and *C*.

Table I. Data collection and refinement statistics

	mTIM-3/PtdSer
Data processing	
Space group	R32
Cell dimensions	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	71.9, 71.9, 263.6
α , β , γ (°)	90, 90, 120
Wavelength	0.8726
Resolution (Å)	25–3.0
<i>R</i> _{sym} or <i>R</i> _{merge}	9.4 (33.9)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	6.0 (2.2)
Completeness (%)	94.3 (90.7)
Redundancy	4.3 (3.8)
Refinement	
Resolution (Å)	15–3.0
No. reflections	4946
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	23.5/24.5
No. atoms	
Protein (A/B)	849/862
PtdSer/Ca ²⁺	16/1
Water	2
<i>B</i> -factors	
Protein (A/B)	108/82
PtdSer/Ca ²⁺	104/93
Water	40
Root-mean-square deviations	
Bond lengths (Å)	0.003
Bond angles (°)	0.793

Diffraction data statistics at the highest resolution shell are shown in parentheses. *B* factors for the two mTIM-3 IgV domains (A and B) found at the asymmetric unit of the crystals are shown. The PtdSer ligand and the Ca²⁺ ion were bound only to molecule B.

onto the GFC β -sheet is preserved (Fig. 2A, 2B). The bottom of the CC' loop is bridged to the β -sheet by two disulfide bonds, whereas the tip is hydrogen-bonded to the conserved Arg and Lys residues

on the F and G β -strands, respectively (Fig. 2A). The overall folding of the mTIM-3 polypeptide backbone with DCPTdSer is highly similar to the reported structure without ligand (root-mean-square deviation of 1.05 Å for C α comparison of 108 residues) (Fig. 2B). However, there are relevant differences in some of the residues at the PtdSer binding site. The Trp residue at the tip of the CC' loop is rotated and distant from the FG loop (Fig. 2B), allowing accommodation of the PtdSer molecule (Fig. 2C, left), which can then fit between the CC' and FG loops that build the MILIBS cavity. In the structure of mTIM-3 without the ligand, this Trp faces toward the FG loop (Fig. 2B) and connects the CC' and FG loops, closing the MILIBS cavity (Fig. 2C, right). There are also minor changes in the conformations of FG loop residues (Fig. 2B). The shift in the side chain of the Asn allows its coordination to the metal ion coordinated with the phosphate of PtdSer (see below).

PtdSer binds in the MILIBS and coordinates a metal ion in the mTIM-3 IgV domain

There were marked differences in the electron density filling the MILIBS between the two molecules of the asymmetric unit (data not shown), and a clearly bound DCPTdSer molecule appeared only in molecule B (shown in Fig. 3A). Electron density contiguous to the phosphate of DCPTdSer in molecule B was modeled as a metal ion, also seen in the mTIM-4/DCPTdSer complex structure solved at a higher resolution (11). The two fatty acid side chains linked to the glycerol of PtdSer were poorly defined in the structure, and they have not been included in the refined structure (Fig. 3A). The hydrophilic moiety of PtdSer penetrated into the pocket. The hydrophobic regions of the phospholipid were between the aromatic Trp residue in the tip of the CC' loop and the hydrophobic Leu and Met residues in the FG loop. The binding mode of PtdSer to mTIM-3 was very similar to that described for mTIM-4 (11), although mTIM-4 has a polar Asn instead

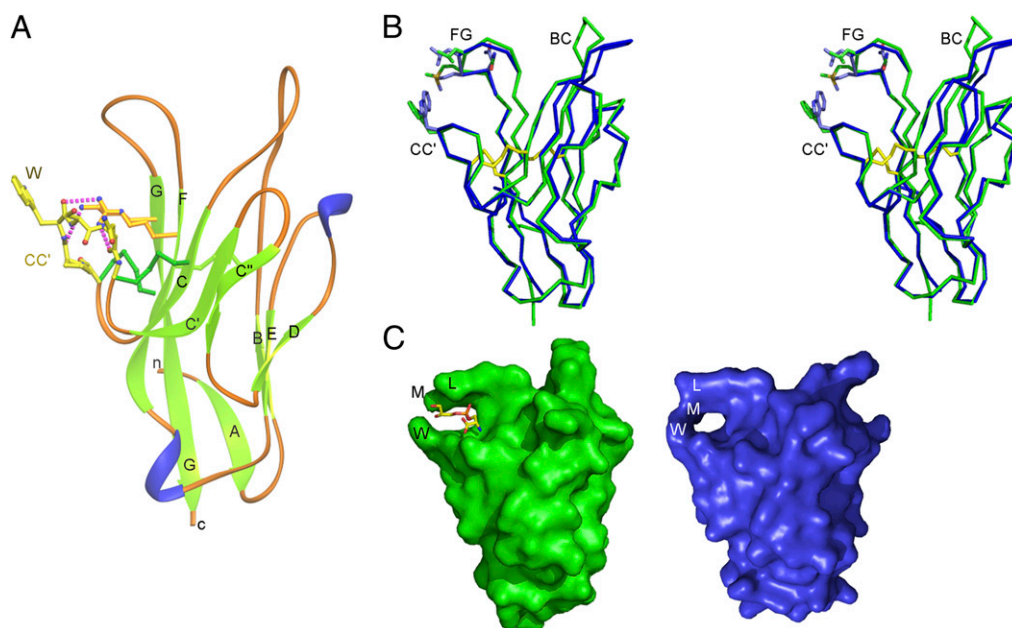


FIGURE 2. Crystal structure of the N-terminal IgV domain of mTIM-3 in complex with PtdSer. *A*, Ribbon diagram of the mTIM-3 IgV domain structure determined in complex with PtdSer. β -Strands are labeled with uppercase letters and shown in light green, whereas the loops are orange and helices are blue. N- and C-terminal ends are marked with lowercase letters. The CC' loop having a Trp residue at the tip is shown in a ball-and-stick representation with carbons in yellow. The noncanonical Cys residues present in all of the TIM proteins and the disulfide bonds bridging the CC' to the C and F β -strands are shown with dark green sticks, whereas the Arg and Lys residues interacting with the tip of the CC' loop are shown with carbons in orange. Hydrogen bonds of the basic residue with the main chain carbonyl atoms of the loop are shown as pink dashed sticks. *B*, Stereoview of the superimposed N-terminal IgV domains of the mTIM-3 structures with PtdSer bound (green) and without PtdSer (blue). C α traces of the domains are shown, with cysteines and disulfide bonds displayed as yellow sticks. Loops at the top of the domain are labeled. The side chains of residues in the tips of CC' (Trp) and FG (Leu and Met) loops and the conserved Asn in the FG loop are shown (sequence in Fig. 1A). *C*, Surface representation of the mTIM-3 IgV domain structures determined with PtdSer bound (PDB ID: 3KAA) (left) and without PtdSer (PDB ID: 2OYP) (right). The PtdSer molecule bound to the MILIBS cavity is shown in stick representation with carbons in yellow, phosphate in orange, oxygens in red, and nitrogens in blue.

of a Trp residue in the tip of the CC' loop and two hydrophobic (WF) residues in the tip of the FG loop (Fig. 1A). Moreover, we determined with the Computed Atlas of Surface Topography of Proteins server (<http://sts-fw.bioengr.uic.edu/castp/>) that the volume of the binding pocket in mTIM-3 (170 Å³) was smaller and thus less accessible than that in the mTIM-4 structure (200 Å³). These differences in the MILIBS may account for the observed differences in PtdSer binding affinity among the TIMs. The phosphate group of PtdSer was coordinated to a metal ion (green sphere in Fig. 3A) that was also bound to two side chain oxygen atoms of Asn and Asp residues as well as two polypeptide backbone carbonyl atoms in the FG loop. The serine moiety of PtdSer was less defined, likely because of contact with a neighboring molecule in the crystal (data not shown). The amino group of the serine interacts with the conserved Asp residue that coordinates with the metal ion, whereas the carboxylate of PtdSer bound to the serine residue in the tip of the CC' loop, similar to the reported mTIM-4/PtdSer complex structure (11).

To verify the contribution of the MILIBS residues in the CC' and FG loops in PtdSer recognition, we carried out site-directed mutagenesis of mTIM-3 and compared PtdSer binding activities (Fig. 3B). The substitution of hTIM-3 residues (VFE) at the tip of the CC' loop for those of the mouse protein (WSQ) significantly decreased the PtdSer binding activity (hCC' mutant). The minimal binding seen with the W/A mutant showed that this is a key PtdSer binding residue at the CC' loop of mTIM-3 (Fig. 3B). Alanine substitution of FG loop residues engaged in metal ion coordination (ND/AA) or interacting with the hydrophobic moiety of PtdSer (LM/AA) abolished mTIM-3 binding to PtdSer, as was observed with mutation of the homologous residues in mTIM-1 and mTIM-4 (11). Therefore, both metal ion coordination and the interaction of the hydrophobic residues with the fatty acid moiety of PtdSer are critical for efficient recognition of PtdSer by TIM proteins.

A model for binding of TIM proteins to PtdSer in a membrane

The critical contribution of the FG loop hydrophobic residues to PtdSer binding shown here for mTIM-3 (Fig. 3) and previously for mTIM-1 and mTIM-4 (8, 11) as well as the contacts of these residues with the fatty acid moiety of PtdSer suggested that they must penetrate the lipid bilayer as modeled for the IgV-like domain of mTIM-4 in Fig. 4A. The polar CC' loop of mTIM-4 and mTIM-1 may interact with the hydrophilic region of the phospholipids, whereas the aromatic Trp residue at the tip of the CC' loop of mTIM-3 would penetrate deeper into the bilayer. Indeed, deletion of the Trp side chain almost abolished mTIM-3 binding to PtdSer (Fig. 3B), whereas substitution of the Asn residue at the tip of the mTIM-4 CC' loop for an Asp residue significantly decreased binding to PtdSer (Fig. 4B).

This model of TIM binding to PtdSer in a membrane suggests that regions of the TIM molecule to each side of the MILIBS must interact with the surface of the cell membrane. The model predicts that the BC loop would be proximal to the membrane surface, and we noticed the presence of an Arg residue in the BC loop of mTIM-1 and mTIM-4, which could mediate electrostatic interactions with the charged phosphate head of membrane phospholipids (Fig. 4A). Substitution of this Arg residue in mTIM-1 (R22A) or mTIM-4 (R25A) decreased PtdSer binding activity ~50%, showing a contribution of the BC loop to recognition of PtdSer in a membrane (Fig. 4B). Thus, residues in the BC loop adjacent to the MILIBS appear to modulate the affinity of the TIM proteins for PtdSer in a membrane structure.

mTIM-3 allelic variants show distinct binding affinities for PtdSer

There are seven amino acid differences between the BALB/c and the HBA alleles of TIM-3 (3), clustered in either the β -strand A or the BC loop (Fig. 1A). To analyze the contribution of those

polymorphisms to PtdSer binding, we compared the binding activities of HBA and BALB/c TIM-3 proteins with those of BALB/c TIM-3 proteins containing either the four polymorphic amino acids of the HBA β -strand A (called HBA1) or the three polymorphic amino acids of the HBA BC loop (called HBA2) to PtdSer in liposomes immobilized on plastic (Fig. 4C). Binding activity of the HBA TIM-3 was ~50% lower than that of the BALB/c TIM-3. Analysis of the HBA1 and HBA2 mutants showed that the reduced binding was accounted for by the polymorphisms in the BC loop (HBA2) of the IgV domain. The BC loop is also engaged in mTIM-1 and mTIM-4 binding to PtdSer in a membrane (Fig. 4B) and thus is important in all of these TIM proteins. The approximate affinities of the TIM-3-Fc proteins for PtdSer in liposomes, determined from the protein concentration at 50% of binding saturation (data not shown), were 45, 80, and 130 nM, respectively, for BALB/c, HBA, and human TIM-3. The affinity of mTIM-3-Fc for PtdSer, determined on microtiter plates coated with PtdSer without liposomes, carried out as previously reported for TIM-4-Fc (9), was ~10 nM (data not shown) as compared with an affinity of 2 nM for TIM-4 (9). In the absence of liposomes, there was no difference in binding of HBA and BALB/c TIM-3-Fc to PtdSer (data not shown). This is consistent with the location of the TIM-3 polymorphisms in the BC loop, a region that interacts with the membrane surface but not directly with PtdSer.

Cells transfected with mTIM-3 allelic variants bind apoptotic cells with different affinities

To determine whether the BALB/c or HBA alleles of TIM-3 differed in recognition of apoptotic cells, we transfected BALB/c or HBA TIM-3 into 300.19 cells (Fig. 5A) and examined binding to apoptotic cells. Following cocubation, flow cytometry was used to measure binding of PKH67-labeled apoptotic thymocytes to PKH26-labeled TIM-3 transfectants. Apoptotic thymocytes and TIM-3-transfected 300.19 cells could be distinguished by both fluorescence and size (Supplemental Fig. 1). The percentage of TIM-3 transfectants that bind one or more apoptotic thymocytes was determined by gating on PKH26-labeled TIM-3-transfected 300.19 cells (>99% FL-2⁺) and analyzing PKH67 fluorescence (bound apoptotic thymocytes) (Fig. 5B and Supplemental Fig. 1). BALB/c TIM-3-transfected 300.19 cells were more effective in binding apoptotic thymocytes than HBA TIM-3-transfected 300.19 cells (Fig. 5B, 5C). Neither BALB/c nor HBA TIM-3-transfected 300.19 cells bound live thymocytes (Fig. 5C). BALB/c TIM-3-transfected cells consistently demonstrated greater binding of apoptotic cells than HBA TIM-3 transfectants over a period of 30–120 min (Fig. 5D). Control PD-L1-transfected 300.19 cells showed minimal binding of apoptotic cells (Fig. 5C–E). TIM-3 mAb RMT3-23 inhibited the binding of apoptotic thymocytes by HBA TIM-3-transfected cells to the level of control transfected cells and reduced the binding of apoptotic thymocytes by BALB/c TIM-3-transfected cells by 60%, confirming the role of TIM-3 in this process (Fig. 5E).

Calcium is the metal ion used in TIM-3 binding to PtdSer

The structure revealed the presence of a metal ion coordinated to conserved FG loop residues and the phosphate of DCPTdSer (Fig. 3A), where the side chain of Asn⁹⁸ adopts a conformation suited for coordination of the metal ion (Figs. 2B, 3A). Binding of apoptotic cells by BALB/c TIM-3-transfected 300.19 cells was greatly reduced in the presence of 0.5 mM EGTA and eliminated in media containing ≥ 1 mM EGTA (Fig. 5F). Similarly, binding of apoptotic cells by hTIM-3-transfected 300.19 cells was also eliminated in the presence of 1 mM EGTA (Supplemental Fig. 1). Because EGTA specifically binds calcium and not sodium or other divalent cations, this indicates that calcium is the metal ion required for binding of TIM-3 to PtdSer.

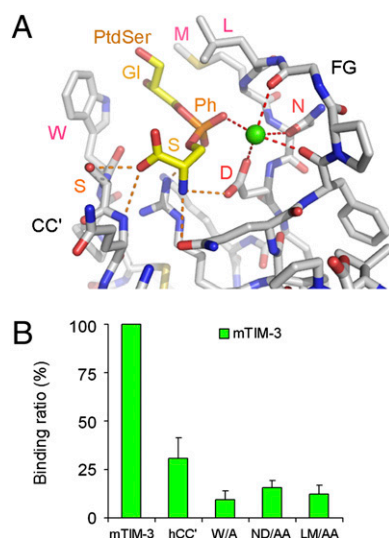


FIGURE 3. Binding of PtdSer to the MILIBS in the mTIM-3 IgV domain. **A**, Detailed view of the mTIM-3 MILIBS structure with a bound DCPTdSer molecule. Stick representation of the DCPTdSer (carbons in yellow) bound to the MILIBS pocket built by the tips of the CC' and FG loops of the N-terminal IgV domain of mTIM-3 (carbons in gray). The DCPTdSer molecule is shown colored as in Fig. 2C and with the glycerol, phosphate, and serine moieties labeled. The metal ion coordinated to the phosphate of DCPTdSer and conserved residues of the FG loop is shown as a green sphere. Coordinations are shown as dashed red lines, whereas hydrogen bonds between the DCPTdSer molecule and the protein are orange dashed lines. Some of the mTIM-3 residues interacting with DCPTdSer and metal ion are labeled. **B**, Binding of mTIM-3 MILIBS mutants to PtdSer. Relative binding (%) of the mutants compared with that of the wild-type BALB/c TIM-3-Fc protein has been plotted. Binding of the mTIM-3-Fc proteins to PtdSer in liposomes was carried out for a range of protein concentrations as described in Fig. 1B and *Materials and Methods*. The hCC' mTIM-3 mutant has the tip region of the CC' loop (WSQ) replaced with the homologous hTIM-3 sequence (VFE). Mutations include residues at the tip of the loops interacting with the apolar chain of DCPTdSer (W/A or LM/AA) or coordinating with the metal ion (ND/AA), as labeled in Fig. 3A. Mean \pm SD of three experiments is shown.

Cells transfected with mTIM-3 allelic variants differ in their capacities to phagocytose apoptotic cells

To determine whether the HBA and BALB/c TIM-3 variants differed in their capacities to phagocytose apoptotic cells, we prepared stably transfected HBA and BALB/c TIM-3 3T3 cells (Fig. 6A). Flow cytometry was used to quantify the engulfment of pHrodo-labeled, apoptotic thymocytes. The pH-sensitive dye pHrodo strongly fluoresces red in acidic conditions, such as those in a phagosome or endosome, but very weakly at neutral pH. Therefore, red fluorescence indicates true engulfment as opposed to cell surface binding. Apoptotic thymocytes were more efficiently phagocytosed by the BALB/c TIM-3-transfected 3T3 cells (90.4% FL-2⁺) than by the HBA TIM-3-transfected 3T3 cells (45.7% FL-2⁺) and were not phagocytosed by vector-transfected 3T3 cells ($p < 0.01$) (Fig. 6B, 6C). The mean fluorescence intensity of BALB/c TIM-3 3T3 cells after phagocytosis was also significantly higher than that of HBA TIM-3 3T3 cells ($p < 0.02$) (Fig. 6C). In addition, engulfment was confirmed using confocal microscopy imaging of CMFDA-labeled BALB/c and HBA TIM-3-transfected 3T3 cells (green) and pHrodo-labeled thymocytes (red) (Fig. 6D), indicating localization in an acidic compartment. BALB/c TIM-3-transfected cells contained 8.8 apoptotic thymocytes per 3T3 cell compared with 3.8 apoptotic thymocytes per HBA TIM-3-transfected 3T3 cell (Fig. 6E). To confirm that

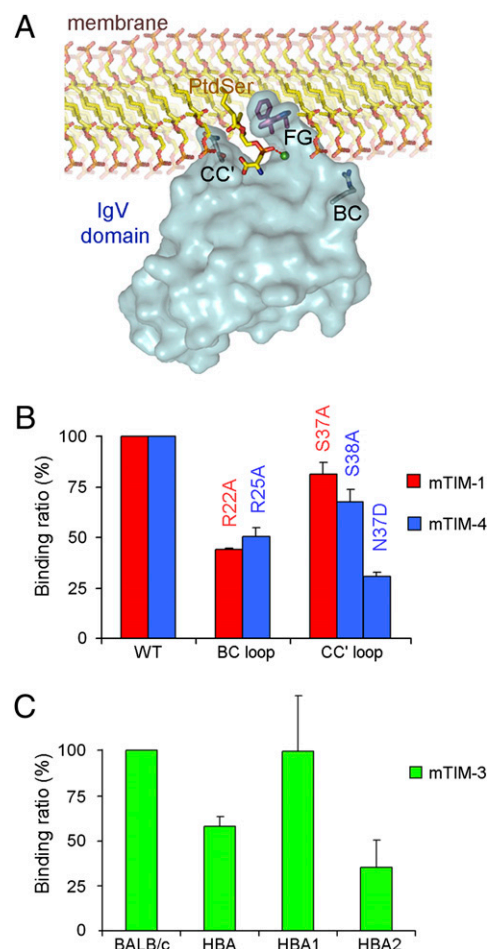


FIGURE 4. Model for TIM protein binding to PtdSer in a membrane and contribution of the mTIM-3 polymorphisms to the binding interaction. **A**, Surface representation of the structure of the IgV domain of mTIM-4 bound to PtdSer (PDB ID: 3BIB) is shown with a phospholipid bilayer membrane. Side chains at the tips of the labeled loops are shown: Arg in the BC loop, Asn-Ser in the CC' loop, and Trp-Phe in the FG loop. The PtdSer and phospholipids are shown in stick representation as described in Fig. 3A. The hydrophilic head moiety of PtdSer penetrates into the MILIBS where the phosphate coordinates with the metal ion (green sphere). The critical contribution of the hydrophobic residues in the tips of the CC' and FG loops that interact with the hydrophobic moiety of PtdSer, shown for mTIM-3 (Fig. 3A, 3B) and elsewhere for mTIM-4 (8, 11), suggests that they must penetrate the lipid bilayer upon TIM protein binding to PtdSer. The BC loop comes close to the charged head of the phospholipids. **B**, Contribution of the BC and CC' loops of mTIM-1 and mTIM-4 to binding to PtdSer in liposomes. Relative binding (%) to the wild-type mTIM-1 and mTIM-4 proteins of mutants with the indicated residue substitution in the loops. Mutated residues are boxed in Fig. 1A. **C**, Contribution of mTIM-3 polymorphisms to the PtdSer binding interaction. Relative binding (%) to BALB/c TIM-3 is shown for the HBA TIM-3 protein and for the HBA1 and HBA2 mutants, which are BALB/c TIM-3 proteins containing the boxed HBA polymorphisms labeled as 1 and 2 in Fig. 1A. Binding of the mTIM-Fc fusion proteins to PtdSer in liposomes was carried out for a range of protein concentrations as described in Fig. 1B and *Materials and Methods*. Mean \pm SD of three experiments is shown in B and C.

PtdSer is the molecule recognized by TIM-3 for phagocytosis of apoptotic cells, we prepared phospholipid liposomes containing various phospholipids and tested their capacities to inhibit phagocytosis by TIM-3 transfectants. Liposomes containing equal amounts of PtdSer and PC reduced phagocytosis in a concentration-dependent manner, with complete inhibition at 100 μ M total phospholipids (Fig. 6F). Liposomes containing PC did not inhibit

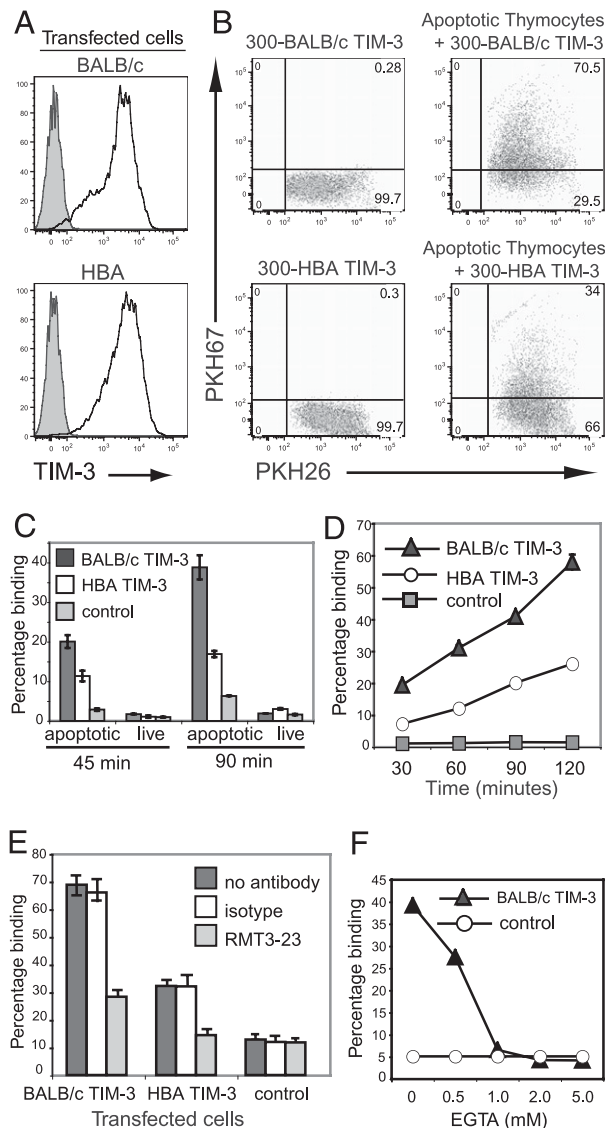


FIGURE 5. BALB/c TIM-3-transfected cells bind apoptotic cells better than HBA TIM-3-transfected cells. *A*, The 300.19 cells stably transfected with BALB/c or HBA TIM-3 were stained with TIM-3 mAb RMT3-23 and analyzed by flow cytometry, gating on live cells. *B*, PKH67-labeled apoptotic thymocytes and PKH26-labeled BALB/c TIM-3-transfected 300.19 cells were incubated for 90 min and analyzed by flow cytometry for binding of labeled cells. Fluorescence profiles of BALB/c or HBA TIM-3-transfected cells alone (*left*) and analysis of the coculture (*right*) are shown. Percentage of transfected cells binding PKH67-labeled apoptotic cells is determined by gating on the forward light scatter/side light scatter high population of 300.19 cells and analyzing dual fluorescence. *C*, Binding of apoptotic or live thymocytes by BALB/c TIM-3-transfected, HBA TIM-3-transfected, or control PD-L1-transfected 300.19 cells. Cells were labeled and analyzed as in *B*. Percentage of transfected cells binding PKH67-labeled thymocytes is plotted. *D*, Time course of binding of apoptotic thymocytes by BALB/c TIM-3-transfected, HBA TIM-3-transfected, or control PD-L1-transfected 300.19 cells. Cells were labeled and analyzed as in *B* at the indicated times. *E*, Blockade of apoptotic cell binding by TIM-3 mAb. Transfected cells were preincubated for 30 min with TIM-3 mAb RMT3-23 or isotype control followed by PKH67-labeled apoptotic thymocytes for 90 min. *F*, Binding of apoptotic cells by BALB/c TIM-3-transfected 300.19 cells was measured as described above, in media containing the indicated concentrations of EGTA. All of the binding assays were done in triplicate, and mean values are plotted with SD and are representative of three or more experiments.

phagocytosis. These data show that BALB/c TIM-3 binds PtdSer and apoptotic cells better than HBA TIM-3 and phagocytoses apoptotic cells more efficiently (Figs. 4–6).

hTIM-3 facilitates binding and phagocytosis of apoptotic cells

We then examined the capacity of hTIM-3 to bind and mediate phagocytosis of apoptotic cells. Fig. 7*A* shows surface expression of hTIM-3 and hTIM-1 on transfected 300.19 cells and reactivity with specific mAbs. hTIM-3-transfected 300 cells bound apoptotic cells, and this binding was inhibited by hTIM-3 mAb 7D11 (Fig. 7*B*, 7*C*). hTIM-1-transfected 300.19 cells bound apoptotic cells as expected (8), and this binding was more robust, as demonstrated by a higher percentage of apoptotic cells bound to hTIM-1- than hTIM-3-transfected cells (Fig. 7*B*). hTIM-3-transfected cells did not bind live cells (Supplemental Fig. 1). Liposomes containing equal amounts of PtdSer and PC reduced hTIM-3-mediated binding of apoptotic thymocytes in a concentration-dependent manner with complete inhibition at 100 μ M total phospholipids (Fig. 7*D*). Liposomes containing PC did not inhibit binding, confirming the specific recognition of PtdSer. We compared the binding of apoptotic cells by mTIM-3-allelic variants and hTIM-3. BALB/c TIM-3-transfected cells demonstrated the highest binding of apoptotic cells, followed by hTIM-3 and HBA TIM-3 (Fig. 7*E* and data not shown).

Apoptotic thymocytes were efficiently phagocytosed by hTIM-3-transfected 3T3 cells (expression shown in Supplemental Fig. 2) but not by vector-transfected control cells (Fig. 7*F*). Live thymocytes were not phagocytosed by hTIM-3-transfected 3T3 cells (data not shown). Engulfment was confirmed using confocal microscopy imaging of CMFDA-labeled hTIM-3-transfected 3T3 cells (green) and pHrodo-labeled thymocytes (red) (Fig. 7*G*, 7*H*).

We identified five coding region polymorphisms in hTIM-3 (Genbank), one in the IgV domain and four in the mucin domain (Fig. 7*I*). The IgV domain polymorphism is predicted to be at the beginning of the BC loop, a region shown here to be adjacent to the MILIBS and involved in interaction with the membrane surface.

TIM-transfected lymphoid cells form conjugates with but do not phagocytose apoptotic cells

Although the phagocytic abilities of cells such as macrophages, DCs, or TIM-transfected 3T3 cells are well documented, the capacity of lymphoid cells to function as phagocytic cells is less well characterized. Because TIM-1 and TIM-3 are expressed on CD4⁺ T cell subsets (3, 15), we investigated the capacity of TIM-expressing lymphoid cells to phagocytose apoptotic cells. The hTIM-3 transfected 300.19 cells (a pre-B cell line) formed conjugates with but did not phagocytose apoptotic thymocytes (Fig. 8*A*, 8*B*). Untransfected 300.19 cells did not bind apoptotic thymocytes (Fig. 5*C–E* and data not shown). We also tested whether T cells expressing TIM-3 have the capacity to phagocytose apoptotic cells. CMFDA-labeled BALB/c TIM-3-transfected DO11.10 T hybridoma cells (Supplemental Fig. 2) avidly formed conjugates with but did not phagocytose CMTMR-labeled apoptotic thymocytes or eryptotic RBCs (Fig. 8*C*, 8*D*).

We examined stable TIM-1 transfectants of DO11.10 hybridoma cells (Supplemental Fig. 2) to determine whether the inability of TIM-3-transfected 300.19 or DO11.10 hybridoma cells to phagocytose was specific for TIM-3 or a general property of lymphoid cells. TIM-1-transfected DO11.10 hybridoma cells (red) avidly formed conjugates with but did not phagocytose apoptotic thymocytes (green) as demonstrated using confocal microscopy (Fig. 8*E*). TIM-1 mAb 3B3 blocked the binding of apoptotic cells by TIM-1-transfected DO11.10 cells, indicating that binding was mediated by TIM-1 recognition of PtdSer-expressing apoptotic cells (Fig. 8*F*). Untransfected DO11.10 T hybridoma cells, which did not express detectable levels of cell surface TIM-1 or TIM-3, showed minimal binding of apoptotic cells by flow cytometry (Fig. 8*F*). We also showed that normal

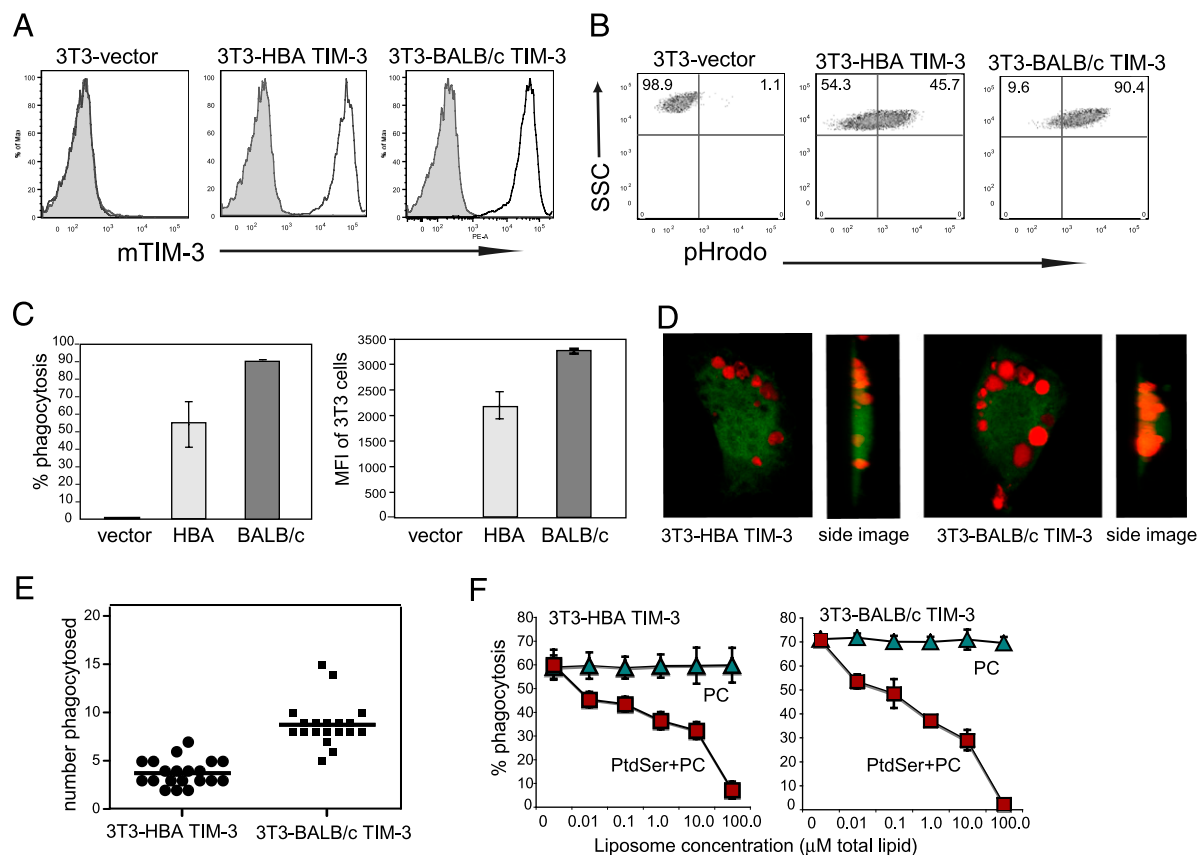


FIGURE 6. BALB/c TIM-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells better than HBA TIM-3. **A**, TIM-3 expression on BALB/c and HBA TIM-3 NIH 3T3 transfectants. NIH 3T3 cells stably transfected with HBA TIM-3, BALB/c TIM-3, or vector were stained with PE-conjugated anti-mTIM-3 mAb RMT3-23 (heavy line) or PE-conjugated isotype control Ab (shaded histogram) and analyzed by flow cytometry. **B**, TIM-3-mediated phagocytosis of apoptotic cells. HBA TIM-3, BALB/c TIM-3, and vector-transfected NIH 3T3 cells were incubated with pHrodo-labeled apoptotic thymocytes for 3 h, washed three times, detached with PBS with 0.5 mM EDTA, and analyzed by flow cytometry. Dot plots are shown with the percentage of transfected cells that have phagocytosed apoptotic cells indicated in the upper right quadrant. **C**, Percentage and mean fluorescence intensity of TIM-3 3T3 cells that have phagocytosed pHrodo-labeled apoptotic cells. Data from three experiments are shown as mean \pm SD. **D**, Confocal images of TIM-3-mediated phagocytosis. CMFDA-labeled NIH 3T3 transfectants were incubated with pHrodo-labeled apoptotic thymocytes for 3 h, washed three times, and fixed. **E**, The number of phagocytosed, pHrodo-labeled apoptotic thymocytes in TIM-3-transfected 3T3 cells were counted. Each data point represents an individual 3T3 cell visualized as in **D**. **F**, Phagocytosis of eryptotic RBCs by TIM-3-transfected 3T3 cells was inhibited by liposomes containing a 50:50 mix of PtdSer and PC but not by PC alone. The 3T3 cells were preincubated with liposomes for 15 min prior to addition of PKH26-labeled eryptotic RBCs for 45 min. Cells were washed and analyzed by flow cytometry. All of the experiments were repeated at least three times with similar results.

CD4⁺ T cells from a TIM-1 transgenic mouse formed conjugates with but did not phagocytose apoptotic cells (Fig. 8G, 8H). Together these data indicate that TIM-1- or TIM-3-expressing lymphoid cells conjugate with but do not phagocytose apoptotic cells and suggest that recognition of apoptotic cells may play a role in T cell effector function.

Expression and inducibility of TIM-3 in mouse and human cells and cell lines

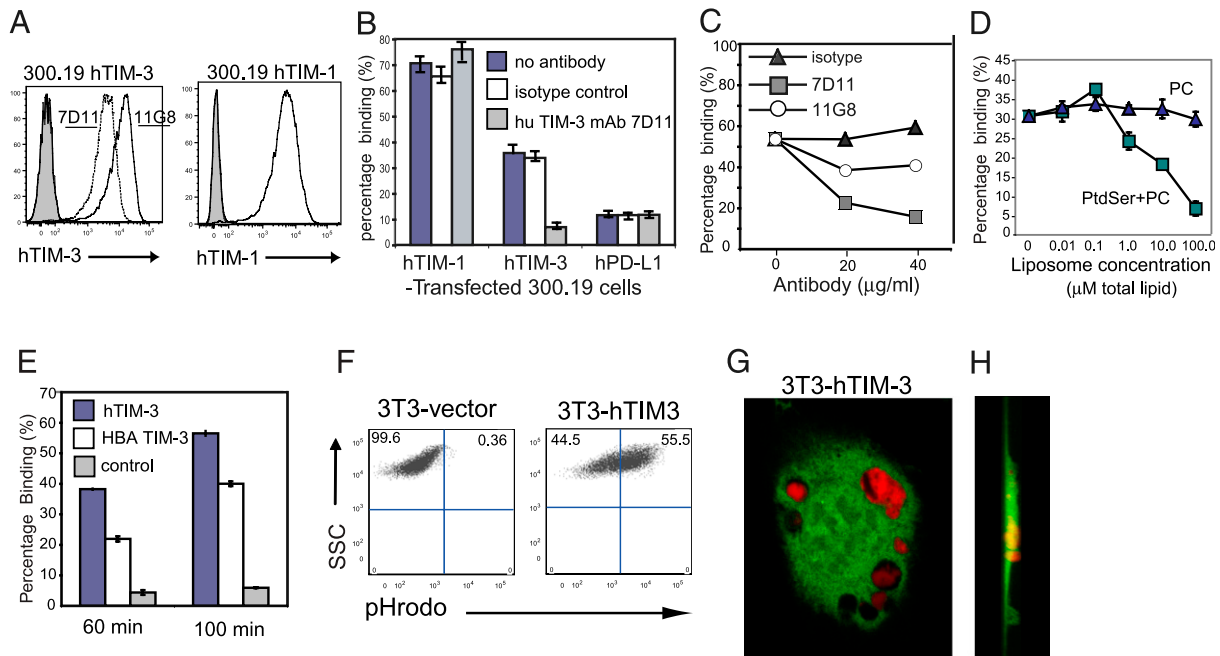
We next examined TIM-3 expression on a variety of different cells. Mouse peritoneal resident macrophages expressed low levels of TIM-3, high levels of TIM-4, and no detectable TIM-1 (Fig. 9A). BMDCs demonstrated low levels of surface TIM-3 expression but not detectable levels of TIM-4 or TIM-1 (Fig. 9B and data not shown). Exposure of BMDCs to cholera toxin for 24 h enhanced TIM-3 but not TIM-4 or TIM-1 expression (Fig. 9B). Cholera toxin-treated BMDCs phagocytosed apoptotic thymocytes, and blockade with TIM-3 mAb reduced phagocytosis by ~50% (Fig. 9C), indicating that the expression of TIM-3 contributed to the phagocytic capacity of the BMDCs.

Primary bronchial epithelial cell lines expressed moderate amounts of cell surface TIM-3 but not TIM-1 or TIM-4 (Fig. 9D).

In mouse macrophage cell lines, TIM-3 was expressed strongly in RAW264.7 and very weakly in MH-S and was not detectable in PMJ2R (Fig. 9E). In human cell lines, TIM-3 was weakly expressed on the KMA and MD macrophage cell lines but not on the THP-1 monocytic leukemia cell line (Fig. 9F). PMA can induce THP-1 cells to differentiate from monocytic leukemia cells into macrophages (27). Stimulation of THP-1 with PMA (5 ng/ml) induced expression of TIM-3 by 24 h, and expression increased at 48 and 72 h (Fig. 9G). These results indicate that TIM-3 is expressed on a diverse range of macrophage and DC populations in mouse and human. TIM-3 expression can be upregulated following exposure to inflammatory stimuli and contributes to the phagocytic capacity of the cells.

Discussion

The *Tim* gene family was identified using a congenic mouse model in which polymorphisms in both TIM-1 and TIM-3 were associated with Th1/Th2 differentiation and AHR between BALB/c and congenic HBA mice. The HBA alleles of TIM-1 and TIM-3 originated from a DBA/2 ancestor (28) and are identical to C57BL/6 alleles. Here, we show that the BALB/c allele of TIM-3 bound PtdSer and mediated the recognition and phagocytosis of apoptotic cells more efficiently than



Alignment of human TIM-3 and polymorphisms

```

MFSLPFDVCVLLLLLLLLLRSSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWGKGACPVFECGNVVLRTDERDV
L
NYWTSRYWLNQDFRKGVDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNKLKLVIPAKVTPAPTRQRDFTAAPFR
M
MLTTRGHGPAETQTLGSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGATIRIGIYIGAGICAGLALALIFGALIFK
T
WYSHSKEKIQNLSLISLANLPPSGLANAVAEGIRSEENIYTIENVYEVVEEPNEYCYVSSRQQPSQPLGCRFAM
L
PLISLANLPPSGLANAVAEGIRSEENIYTIENVYEVVEEPNEYCYVSSRQQPSQPLGCRFAMP

```

FIGURE 7. hTIM-3-transfected cells bind and phagocytose apoptotic cells. **A**, TIM-3 and TIM-1 expression on hTIM-3 and hTIM-1 transfected 300.19 cells. Cells stably transfected with hTIM-3 or hTIM-1 were stained with anti-hTIM-3 mAbs 7D11 or 11G8, hTIM-1 mAb, or isotype control Ab (shaded histogram), followed by PE-conjugated anti-mouse IgG, and analyzed by flow cytometry. **B**, PKH26-labeled hTIM-3-, hTIM-1-, or control PD-L1-transfected 300.19 cells were preincubated with hTIM-3 mAb 7D11 or isotype control for 30 min prior to addition of PKH67-labeled apoptotic thymocytes. Cells were cocultured for an additional 90 min and analyzed by flow cytometry. One experiment representative of three is shown. **C**, hTIM-3-transfected 300.19 cells were preincubated with the indicated concentrations of hTIM-3 mAb 7D11 or 11G8 or isotype control for 30 min prior to addition of PKH67-labeled apoptotic thymocytes. Cells were cocultured for an additional 90 min and analyzed by flow cytometry. **D**, Binding of apoptotic thymocytes by hTIM-3-transfected 300.19 cells was inhibited by liposomes containing a 50:50 mix of PtdSer and PC but not by PC alone. Transfected cells were preincubated with liposomes for 15 min prior to addition of PKH67-labeled apoptotic thymocytes for 30 min. Cells were analyzed by flow cytometry. **E**, Comparison of binding of apoptotic cells by hTIM-3- and mTIM-3-transfected 300.19 cells. **F**, hTIM-3-mediated phagocytosis of apoptotic cells. hTIM-3- and vector-transfected NIH 3T3 cells were incubated with pHrodo-labeled apoptotic thymocytes for 3 h, washed three times, detached with PBS with 0.5 mM EDTA, and analyzed by flow cytometry. Dot plots are shown with the percentage of transfected cells phagocytosing apoptotic cells indicated in the upper right quadrant. **G** and **H**, Confocal images of hTIM-3-mediated phagocytosis. CMFDA-labeled hTIM-3-transfected NIH 3T3 cells were incubated with pHrodo-labeled apoptotic thymocytes for 3 h, washed three times, and fixed, and images were obtained as described in Fig. 6. **I**, The hTIM-3 Refseq is shown with polymorphisms indicated below.

the HBA allele of TIM-3. Polymorphisms in the BC loop of the IgV domain were responsible for these differences. This is the first report of a functional difference between the BALB/c and HBA alleles of TIM-3 or TIM-1 and suggests that functional differences in the TIM-3 alleles may contribute to the Th1/Th2 phenotypic differences between the strains. Further support for a role for TIM-3 in these differences is provided by the observation that blockade of TIM-3 with mAb in BALB/c modulates Th1/Th2 responses and AHR (29). We also showed that cells expressing hTIM-3 bound and phagocytosed apoptotic cells. Similarly in humans, one study has linked asthma to both TIM-1 and TIM-3 polymorphisms (30), suggesting that TIM-1 and TIM-3 may contribute together to Th1 and Th2 differentiation. However, precise mechanisms whereby recognition of apoptotic cells by TIM-3 variants mediates differences in immune responsiveness require further investigation.

In this study, we determined the structure of the mTIM-3/PtdSer complex, which showed that except for mTIM-2, the TIM proteins have a MILIBS motif designed for recognition of PtdSer, thus demonstrating a conserved binding mode in TIM family members. In the two TIM/PtdSer structures solved to date, the hydrophobic region of PtdSer interacts with hydrophobic residues on the tips of loops building the MILIBS, whereas the hydrophilic moiety of PtdSer penetrates into the binding pocket. The metal ion coordination must provide the specificity for phospholipid recognition. The ligand binding cleft on the GFC β -sheet defined in the ligand-free mTIM-3 structure overlaps with the PtdSer binding pocket and is distinct from the galectin-9 binding site on an N-linked glycan on the opposite side of the IgV domain from the MILIBS (10). Regions near the MILIBS, such as the BC loop, also contribute to the binding of TIM proteins to PtdSer in a membrane. According to our model, this

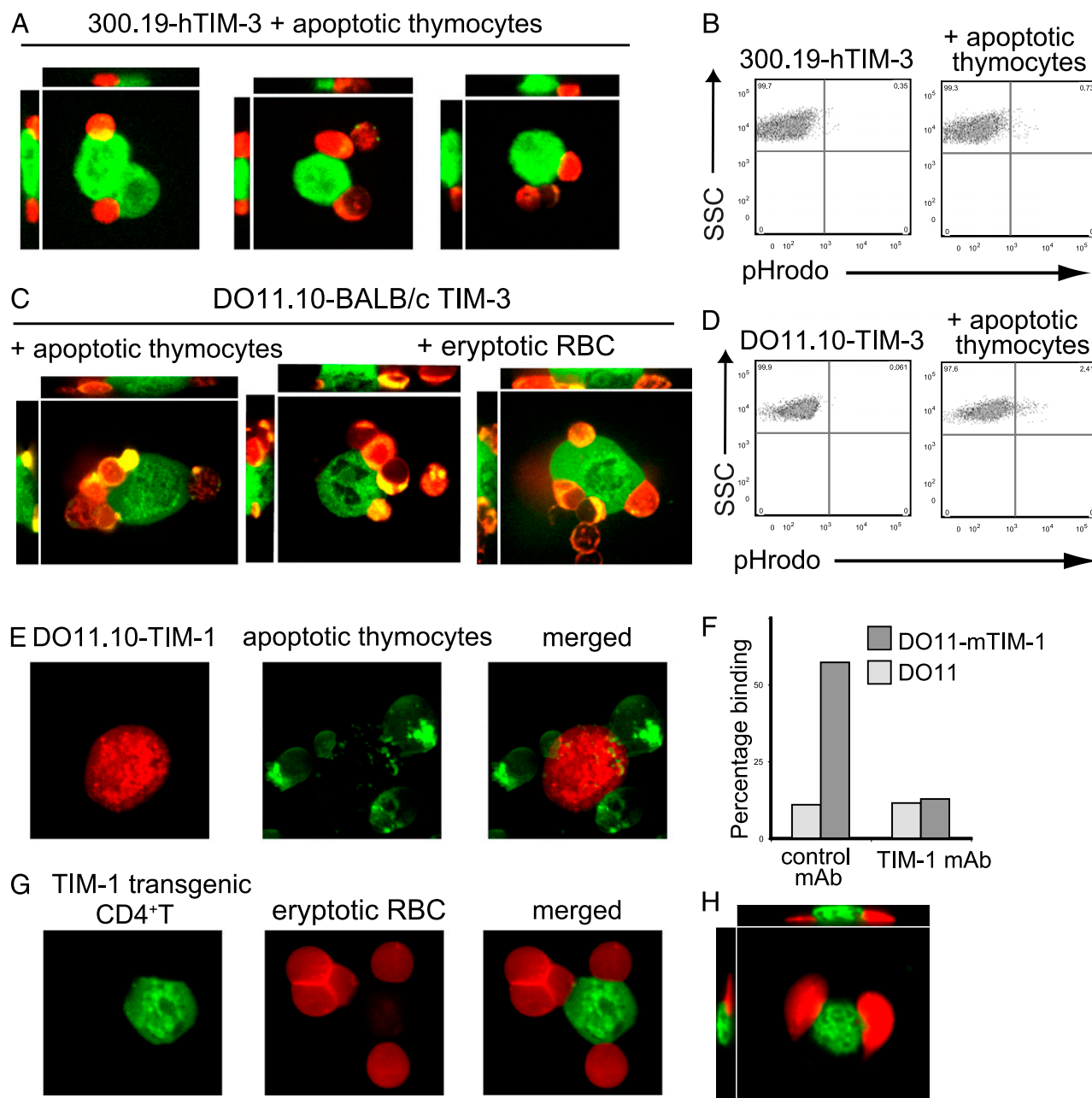


FIGURE 8. TIM-3-transfected lymphocytes bind but do not phagocytose apoptotic cells. *A*, CMFDA-labeled hTIM-3-transfected 300.19 cells (green) were cocultured with CMTMR-labeled apoptotic thymocytes (orange) for 60 min and visualized by confocal microscopy. *B* and *D*, Apoptotic thymocytes were labeled with the pH-sensitive dye pHrodo, incubated with hTIM-3-transfected 300.19 cells (*B*) or BALB/c TIM-3-transfected DO11.10 T hybridoma cells (*D*) for 2 h, and then washed. The engulfment of pHrodo-labeled apoptotic cells from the cell surface (colorless at neutral pH) into acidic cell compartments (red at acidic pH) was determined by flow cytometry. Dot plots are shown with the percentage of transfected cells phagocytosing apoptotic cells indicated in the upper right quadrant. *Left panel* shows DO11.10 or 300.19 cells incubated without apoptotic thymocytes; *right panel* cells incubated with apoptotic thymocytes. *C*, CMFDA-labeled BALB/c TIM-3-transfected DO11.10 T hybridoma cells (green) were cocultured with CMTMR-labeled apoptotic thymocytes or eryptotic RBCs (orange) for 60 min and visualized by confocal microscopy. Images of three DO11.10 cells with different trajectories of confocal sections are shown. Each set of three images shows one DO11.10 cell as follows: perpendicular view (*bottom right*); side view, longitudinal section (*left*); side view, horizontal section (*top right*). *E*, CMTMR-labeled mTIM-1-transfected DO11.10 hybridoma cells (orange) were cultured with PKH67-labeled apoptotic thymocytes (green) for 60 min and visualized by confocal microscopy. *F*, mTIM-1-transfected or untransfected DO11.10 T hybridoma cells were preincubated for 20 min with TIM-1 mAb 3B3 or isotype control followed by PKH67-labeled apoptotic thymocytes for 45 min. Flow cytometry was used to quantitate the binding. *G*, CD4⁺ T cells purified from a TIM-1 transgenic mouse were activated with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs, then labeled with CMFDA (green), incubated with CMTMR-labeled eryptotic RBCs (red), and examined by confocal microscopy. *H*, Images of cells as in *G*. Eryptotic RBCs were localized outside the TIM-1⁺ CD4 T cell by the longitudinal (*left panel*) and perpendicular (*upper panel*) trajectories of three-dimensional confocal sections.

additional interaction site is likely to interact with the membrane surface and not directly with PtdSer, such as proposed for the binding of protein kinase C to PtdSer (31). Differences in the cavity size and the membrane-interacting residues, at both the tips of the

CC' and FG loops and the regions surrounding the MILIBS, could modulate the TIM binding affinity for PtdSer and account for the differences observed among TIM proteins. The highly conserved TIM-PtdSer interactions observed in the TIM/PtdSer complex

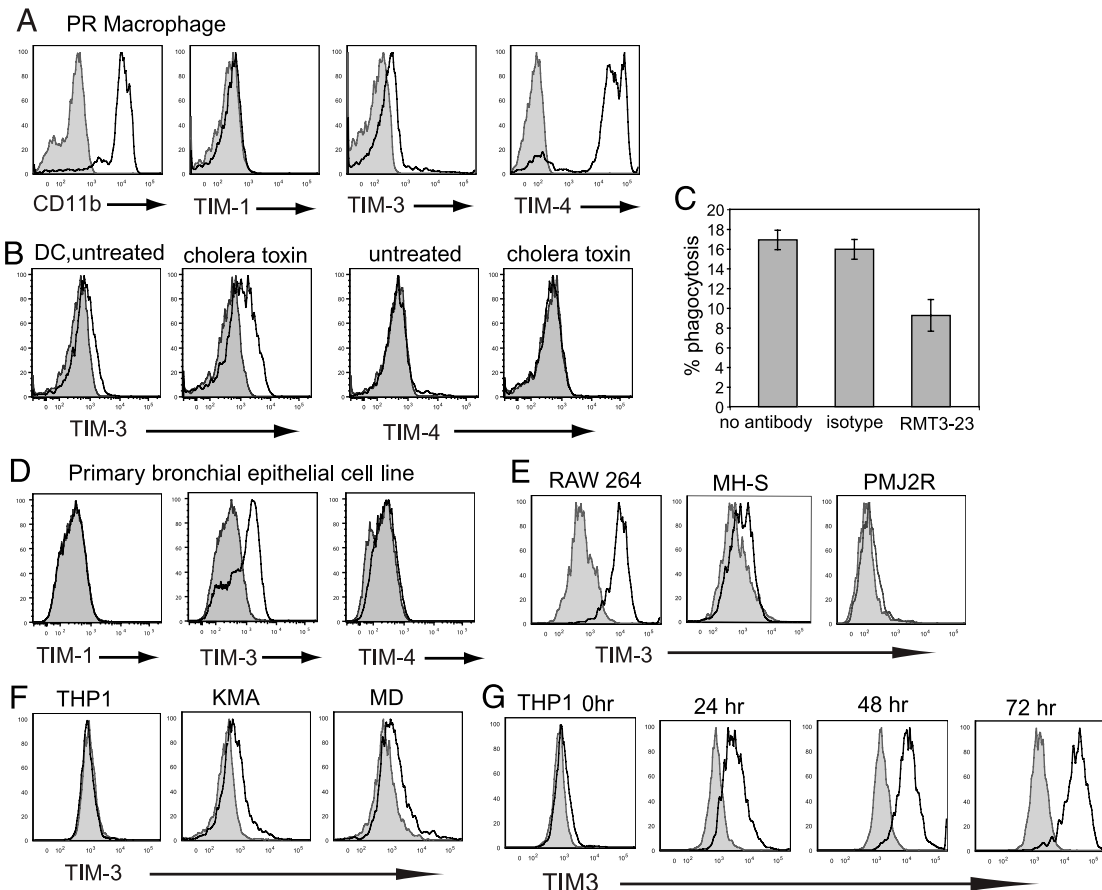


FIGURE 9. TIM-3 expression and inducibility in mouse and human cell lines. *A*, Expression of TIM-1, TIM-3, and TIM-4 in mouse peritoneal resident macrophages. Mouse peritoneal resident macrophages were enriched, stained with CD11b, TIM-1, TIM-3, and TIM-4 Abs, and analyzed by flow cytometry. Heavy line represents staining with specific mAb, and shaded histogram represents isotype control. *B*, BMDCs were exposed to 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cholera toxin for 24 h and analyzed for TIM expression. *C*, Cholera toxin-treated BMDCs were preincubated with TIM-3 mAb or isotype control followed by pHrodo-labeled apoptotic thymocytes for 1 h. Phagocytosis was analyzed by flow cytometry. *D*, Primary bronchial epithelial cell lines were analyzed for TIM expression. *E* and *F*, Mouse macrophage cell lines RAW264.7, MH-S, and PMJ2R (*E*) and human macrophage cell lines THP1, KMA, and MD (*F*) were stained with PE-conjugated anti-mTIM-3 mAb RMT3-23 or anti-hTIM-3 mAb 11G8, respectively, and analyzed by flow cytometry. Heavy line represents staining with TIM-3 mAb, and shaded histogram represents isotype control. *G*, Human macrophage cell line THP-1 was induced to differentiate by PMA (5 ng/ml), and cells were stained with PE-conjugated anti-hTIM-3 mAb 11G8 after 0, 24, 48, and 72 h and analyzed by flow cytometry. Heavy line represents staining with TIM-3 mAb, and shaded histogram represents isotype control. All of the experiments were repeated at least three times with similar results.

structures prove that the TIM proteins are pattern recognition receptors specialized for recognition of the PtdSer death signal.

Identification of TIM-3 as an additional receptor for PtdSer adds to the versatility of the host in recognition of apoptotic cells. PtdSer is normally localized to the inner leaflet of the plasma membrane, but it is redistributed or exposed to the outer leaflet when the cell undergoes apoptosis, injury, or cell activation. Recognition of PtdSer on the surfaces of apoptotic cells provides a key signal to the phagocyte that triggers engulfment of apoptotic cells, which can result in potent anti-inflammatory effects (32, 33) and protection from autoimmune disease (34). However, phagocytosis of apoptotic cells in association with “danger” signals can induce immune responses and inflammation (35).

DCs, macrophages, and human monocytes (36), including microglial cells in the CNS, all express TIM-3. These APCs have been suggested to regulate immunity by phagocytosing apoptotic cells and cross-presenting Ags in tolerogenic pathways (37), which may be mediated in part by TIM-3 (23). Consistent with this idea, mice deficient in TIM-3 were resistant to development of transplant tolerance (38). In experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis, there is an expanded number of TIM-3⁺ microglial cells, which may function to downmodulate

disease, because treatment with a blocking TIM-3 mAb enhanced demyelination and the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis (15, 39) and induced TNF- α production by microglial cells (36). In some systems, engagement of TIM-3 on APCs may enhance inflammation by increasing inflammatory cytokine production; however, this may be due to coactivation with TLR agonists (36). Considering that myelin is a membrane with normal compartmentalization of PtdSer (40), future studies on multiple sclerosis will need to clarify the role of TIM-3⁺ microglial cells in the phagocytosis of apoptotic myelin and cross-presentation of myelin Ags to T cells.

In contrast to APCs, we showed that T cells that express TIM-3 form conjugates with but do not phagocytose apoptotic cells. The failure of T cells to engulf apoptotic cells was probably not due to the small size of the T cells, because small erythrotic RBCs or fragments of U937 cells were not phagocytosed and large T cell hybridoma cells or pre-B cells transfected with TIM-3 were still unable to phagocytose apoptotic cells. It is possible that lymphocytes lack some cellular machinery required for engulfment or alternatively have an active “do not eat” receptor system (41). Cross-linking of TIM-3 on T cells by apoptotic cells instead may provide a proapoptotic signal to the T cell, as is induced by

binding of TIM-3 on Th1 or Th17 cells by galectin-9, another ligand of TIM-3 (7, 42). TIM-3 has an intracellular tyrosine phosphorylation motif, and cross-linking TIM-3 with mAb induces tyrosine phosphorylation. The induction of a proapoptotic signal by TIM-3 in T cells would also be consistent with a negative regulatory role for TIM-3 in immunity (23). This effect may depend on the affinity of the interaction, which we have shown is different for BALB/c versus HBA alleles.

In contrast, TIM-1 is expressed on Th2 cells, invariant NK T cells, and mast cells (43) and costimulates T cell activation and cytokine production (6, 44). TIM-1-expressing T cells avidly form conjugates with apoptotic cells, suggesting that this interaction provides a signal to the T cell that could result in T cell expansion, cytokine production, or both.

The finding that TIM gene family members TIM-1, TIM-3, and TIM-4, which have distinct patterns of expression on distinct cell types or on cells at specific stages of activation or differentiation, are a family of pattern recognition receptors for PtdSer suggests that the TIM proteins provide a functional repertoire for recognition of apoptotic cells. For example, TIM-1 may bind PtdSer on apoptotic cells and mediate T cell activation, whereas TIM-3 on T cells may mediate T cell elimination, and TIM-4 on APCs may mediate apoptotic cell clearance resulting in tolerance. Previous work that identified several receptors mediating apoptotic cell recognition and clearance by phagocytes (45) led to the speculation that the repertoire might provide specificity in the phagocyte response. However, PtdSer receptors such as milk fat globule-EGF-factor 8 and growth arrest-specific gene 6 (46) are widely expressed in somatic cells and do not appear to specify phagocyte behavior following phagocytosis of apoptotic cells (21). We suggest that the TIM molecules evolved as a family of pattern recognition receptors for PtdSer that determine whether apoptotic cell recognition leads to immune activation or tolerance, depending on the TIM molecule engaged and the cell type on which it is expressed.

In summary, we have shown using structural and functional approaches that TIM-3 is a receptor for PtdSer and that polymorphic variants of TIM-3 differ functionally in their recognition of PtdSer and clearance of apoptotic cells. These findings establish a new paradigm for TIM proteins as PtdSer receptors and unify the function of the TIM gene family, which has been associated with asthma and autoimmunity and shown to modulate peripheral tolerance. Demonstration of functional differences in TIM-3 alleles has important implications for understanding of autoimmune disease mechanisms and development of therapeutic approaches.

Acknowledgments

We thank Sheena Tin for excellent technical assistance, the expert help of Jessica Wagner and The Harvard Digestive Diseases Center Imaging Core, and Barbara Osborne for the DO11.10 hybridoma cells. We acknowledge the European Synchrotron Radiation Facility for provision of synchrotron radiation facilities through the MX-861 BAG project.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Rodriguez-Manzanet, R., R. DeKruyff, V. K. Kuchroo, and D. T. Umetsu. 2009. The costimulatory role of TIM molecules. *Immunol. Rev.* 229: 259–270.
- Su, E. W., J. Y. Lin, and L. P. Kane. 2008. TIM-1 and TIM-3 proteins in immune regulation. *Cytokine* 44: 9–13.
- McIntire, J. J., S. E. Umetsu, O. Akbari, M. Potter, V. K. Kuchroo, G. S. Barsh, G. J. Freeman, D. T. Umetsu, and R. H. DeKruyff. 2001. Identification of *Tapr* (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked *Tim* gene family. *Nat. Immunol.* 2: 1109–1116.
- Kuchroo, V. K., D. T. Umetsu, R. H. DeKruyff, and G. J. Freeman. 2003. The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 454–462.
- McIntire, J. J., S. E. Umetsu, C. Macaubas, E. G. Hoyte, C. Cinnioğlu, L. L. Cavalli-Sforza, G. S. Barsh, J. F. Hallmayer, P. A. Underhill, N. J. Risch, et al. 2003. Immunology: hepatitis A virus link to atopic disease. *Nature* 425: 576.
- Umetsu, S. E., W. L. Lee, J. J. McIntire, L. Downey, B. Sanjanwala, O. Akbari, G. J. Berry, H. Nagumo, G. J. Freeman, D. T. Umetsu, and R. H. DeKruyff. 2005. TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. *Nat. Immunol.* 6: 447–454.
- Zhu, C., A. C. Anderson, A. Schubart, H. Xiong, J. Imitola, S. J. Khoury, X. X. Zheng, T. B. Strom, and V. K. Kuchroo. 2005. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat. Immunol.* 6: 1245–1252.
- Kobayashi, N., P. Karisola, V. Peña-Cruz, D. M. Dorfman, M. Jinushi, S. E. Umetsu, M. J. Butte, H. Nagumo, I. Chernova, B. Zhu, et al. 2007. TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. *Immunity* 27: 927–940.
- Miyashita, M., K. Tada, M. Koike, Y. Uchiyama, T. Kitamura, and S. Nagata. 2007. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* 450: 435–439.
- Cao, E., X. Zang, U. A. Ramagopal, A. Mukhopadhyaya, A. Fedorov, E. Fedorov, W. D. Zeng, J. W. Lary, J. L. Cole, H. Deng, et al. 2007. T cell immunoglobulin mucin-3 crystal structure reveals a galectin-9-independent ligand-binding surface. *Immunity* 26: 311–321.
- Santiago, C., A. Ballesteros, L. Martínez-Muñoz, M. Mellado, G. G. Kaplan, G. J. Freeman, and J. M. Casasnovas. 2007. Structures of T cell immunoglobulin mucin protein 4 show a metal-ion-dependent ligand binding site where phosphatidylserine binds. *Immunity* 27: 941–951.
- Santiago, C., A. Ballesteros, C. Tami, L. Martínez-Muñoz, G. G. Kaplan, and J. M. Casasnovas. 2007. Structures of T cell immunoglobulin mucin receptors 1 and 2 reveal mechanisms for regulation of immune responses by the TIM receptor family. *Immunity* 26: 299–310.
- Fadok, V. A., D. R. Voelker, P. A. Campbell, J. J. Cohen, D. L. Bratton, and P. M. Henson. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 148: 2207–2216.
- Verhoven, B., R. A. Schlegel, and P. Williamson. 1995. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 182: 1597–1601.
- Monney, L., C. A. Sabatos, J. L. Gaglia, A. Ryu, H. Waldner, T. Chernova, S. Manning, E. A. Greenfield, A. J. Coyle, R. A. Sobel, et al. 2002. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 415: 536–541.
- Chakravarti, S., C. A. Sabatos, S. Xiao, Z. Illes, E. K. Cha, R. A. Sobel, X. X. Zheng, T. B. Strom, and V. K. Kuchroo. 2005. Tim-2 regulates T helper type 2 responses and autoimmunity. *J. Exp. Med.* 202: 437–444.
- Rennert, P. D., T. Ichimura, I. D. Sizing, V. Bailly, Z. Li, R. Rennard, P. McCoon, L. Pablo, S. Miklasz, L. Tarilonte, and J. V. Bonventre. 2006. T cell, Ig domain, mucin domain-2 gene-deficient mice reveal a novel mechanism for the regulation of Th2 immune responses and airway inflammation. *J. Immunol.* 177: 4311–4321.
- Sizing, I. D., V. Bailly, P. McCoon, W. Chang, S. Rao, L. Pablo, R. Rennard, M. Walsh, Z. Li, M. Zafari, et al. 2007. Epitope-dependent effect of anti-murine TIM-1 monoclonal antibodies on T cell activity and lung immune responses. *J. Immunol.* 178: 2249–2261.
- Xiao, S., N. Najafian, J. Reddy, M. Albin, C. Zhu, E. Jensen, J. Imitola, T. Korn, A. C. Anderson, Z. Zhang, et al. 2007. Differential engagement of Tim-1 during activation can positively or negatively costimulate T cell expansion and effector function. *J. Exp. Med.* 204: 1691–1702.
- Hanayama, R., M. Tanaka, K. Miyasaka, K. Aozasa, M. Koike, Y. Uchiyama, and S. Nagata. 2004. Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science* 304: 1147–1150.
- Savill, J., I. Dransfield, C. Gregory, and C. Haslett. 2002. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 965–975.
- Ichimura, T., E. J. Asselton, B. D. Humphreys, L. Gunaratnam, J. S. Duffield, and J. V. Bonventre. 2008. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 118: 1657–1668.
- Nakayama, M., H. Akiba, K. Takeda, Y. Kojima, M. Hashiguchi, M. Azuma, H. Yagita, and K. Okumura. 2009. Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation. *Blood* 113: 3821–3830.
- Stockinger, B., and B. Hausmann. 1994. Functional recognition of in vivo processed self antigen. *Int. Immunol.* 6: 247–254.
- Akbari, O., R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2001. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat. Immunol.* 2: 725–731.
- McCoy, A. J., R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, and R. J. Read. 2007. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* 40: 658–674.
- Schwende, H., E. Fitzke, P. Ambs, and P. Dieter. 1996. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J. Leukoc. Biol.* 59: 555–561.
- Ruscetti, S., R. Matthai, and M. Potter. 1985. Susceptibility of BALB/c mice carrying various DBA/2 genes to development of Friend murine leukemia virus-induced erythroleukemia. *J. Exp. Med.* 162: 1579–1587.
- Kearley, J., S. J. McMillan, and C. M. Lloyd. 2007. Th2-driven, allergen-induced airway inflammation is reduced after treatment with anti-Tim-3 antibody in vivo. *J. Exp. Med.* 204: 1289–1294.

30. Wu, Q. W., P. C. Cai, L. Wang, Y. R. Li, L. L. Kong, and L. H. Hu. 2009. Family-based association study of Tim-1 and Tim-3 gene polymorphisms with childhood asthma in Chinese trios. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 150: 252–260.
31. Verdager, N., S. Corbalan-Garcia, W. F. Ochoa, I. Fita, and J. C. Gómez-Fernández. 1999. Ca^{2+} bridges the C2 membrane-binding domain of protein kinase $\text{C}\alpha$ directly to phosphatidylserine. *EMBO J.* 18: 6329–6338.
32. Fadok, V. A., D. L. Bratton, A. Konowal, P. W. Freed, J. Y. Westcott, and P. M. Henson. 1998. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest.* 101: 890–898.
33. Huynh, M. L., V. A. Fadok, and P. M. Henson. 2002. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. *J. Clin. Invest.* 109: 41–50.
34. Ravichandran, K. S., and U. Lorenz. 2007. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 964–974.
35. Albert, M. L., B. Sauter, and N. Bhardwaj. 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392: 86–89.
36. Anderson, A. C., D. E. Anderson, L. Bregoli, W. D. Hastings, N. Kassam, C. Lei, R. Chandwaskar, J. Karman, E. W. Su, M. Hirashima, et al. 2007. Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells. *Science* 318: 1141–1143.
37. Chan, A., R. Seguin, T. Magnus, C. Papadimitriou, K. V. Toyka, J. P. Antel, and R. Gold. 2003. Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and its therapeutic implications: termination of CNS autoimmune inflammation and modulation by interferon-beta. *Glia* 43: 231–242.
38. Sánchez-Fueyo, A., J. Tian, D. Picarella, C. Domenig, X. X. Zheng, C. A. Sabatos, N. Manlongat, O. Bender, T. Kamradt, V. K. Kuchroo, et al. 2003. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nat. Immunol.* 4: 1093–1101.
39. Sabatos, C. A., S. Chakravarti, E. Cha, A. Schubart, A. Sánchez-Fueyo, X. X. Zheng, A. J. Coyle, T. B. Strom, G. J. Freeman, and V. K. Kuchroo. 2003. Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nat. Immunol.* 4: 1102–1110.
40. Ohler, B., K. Graf, R. Bragg, T. Lemons, R. Coe, C. Genain, J. Israelachvili, and C. Husted. 2004. Role of lipid interactions in autoimmune demyelination. *Biochim. Biophys. Acta* 1688: 10–17.
41. Kinchen, J. M., and K. S. Ravichandran. 2008. Phagocytic signaling: you can touch, but you can't eat. *Curr. Biol.* 18: R521–R524.
42. Nakae, S., Y. Iwakura, H. Suto, and S. J. Galli. 2007. Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17. *J. Leukoc. Biol.* 81: 1258–1268.
43. Nakae, S., M. Iikura, H. Suto, H. Akiba, D. T. Umetsu, R. H. Dekruyff, H. Saito, and S. J. Galli. 2007. TIM-1 and TIM-3 enhancement of Th2 cytokine production by mast cells. *Blood* 110: 2565–2568.
44. de Souza, A. J., T. B. Oriss, K. J. O'Malley, A. Ray, and L. P. Kane. 2005. T cell Ig and mucin 1 (TIM-1) is expressed on in vivo-activated T cells and provides a costimulatory signal for T cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 17113–17118.
45. Fadok, V. A., D. L. Bratton, and P. M. Henson. 2001. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J. Clin. Invest.* 108: 957–962.
46. Scott, R. S., E. J. McMahon, S. M. Pop, E. A. Reap, R. Caricchio, P. L. Cohen, H. S. Earp, and G. K. Matsushima. 2001. Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* 411: 207–211.